

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Instituto de Biociências
Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular

**INFLUÊNCIA DO GENE *ADRA2A* NA ETIOLOGIA DO TRANSTORNO DE
DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE (TDAH).**

Gabriela Ferraz Rodrigues

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Tatiana Roman

Porto Alegre, março de 2013.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

As pesquisas deste trabalho foram realizadas no Laboratório de Genética Humana Molecular do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e subvencionadas pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), contando ainda com auxílio financeiro do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS. A aluna recebeu bolsa de estudos concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a algumas pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram durante a realização deste trabalho:

À Tatiana Roman por toda a orientação durante este trabalho. Acima de tudo, obrigada pela dedicação, apoio, compreensão, paciência e amizade durante esses cinco anos de trabalho.

A todos os meus colegas do Laboratório de Genética Humana Molecular que tornaram meus dias muito mais divertidos. Agradecimento especial a Gláucia, a Angélica e a Estela que estavam sempre dispostas ajudar nas minhas dúvidas com as análises estatísticas; a Mariana minha companheira de marmita obrigada pelas conversas malucas durante nossos almoços; e ao Guilherme por sempre estar disposto a discutir e trocar ideias relacionadas à educação.

À professora Sídia Callegari-Jacques que tornou a estatística bem mais acessível, além de estar sempre disposta a ensinar e aprender com os alunos.

Ao Elmo pelas conversas futebolísticas do nosso grande time e pela dedicação incondicional ao PPGBM.

Ao pessoal do vôlei da genética e agregados que fizeram com que as segundas-feiras fossem muito mais interessantes.

Aos meus amigos em geral que mesmo não sabendo direito com que eu trabalho sempre me disseram uma palavra de apoio e incentivo.

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

Aos meus familiares por compreenderem a minha ausência em alguns almoços de domingo. Muito obrigada pelo carinho, atenção e por se mostrarem sempre dispostos a ajudarem.

À minha irmã, Mariana, que sempre foi mais do que uma irmã, é uma amiga e minha segunda mãe.

Aos meus pais, José Cesar e Lyane, que sempre me deram todo o suporte em meus estudos e em minhas decisões. Obrigada pelo amor e carinho, vocês são os meus exemplos de pessoas e de profissionais, amo vocês.

À banca examinadora deste trabalho.

RESUMO

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é um dos transtornos psiquiátricos mais comuns da infância e adolescência. É uma doença complexa, com herdabilidade estimada de 76%. Há fortes evidências implicando o sistema noradrenérgico na origem do TDAH. Considerando que o $\alpha 2A$ é o receptor adrenérgico mais prevalente do córtex pré-frontal, região implicada no transtorno, o gene que codifica este receptor (*ADRA2A*) parece ser bastante interessante para estudos moleculares. Trabalhos anteriores do nosso grupo investigaram o polimorfismo *MspI* (rs1800544) deste gene e verificaram associação do genótipo GG principalmente com os sintomas de desatenção. Além disso, o grupo verificou um efeito do alelo G na melhora dos sintomas de desatenção após tratamento com metilfenidato (MPH). O objetivo do presente trabalho foi compreender melhor a influência do gene *ADRA2A* na etiologia do TDAH em nossa população, analisando além do *MspI* os polimorfismos *HhaI* (rs1800545) e *DraI* (rs553668), em um estudo de associação e de farmacogenética. A amostra total é composta por 478 crianças e adolescentes com TDAH e seus pais biológicos, provenientes tanto do Programa do Déficit de Atenção e Hiperatividade (ProDAH), vinculado ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), como de escolas públicas de Porto Alegre, e por 100 controles, também obtidos das escolas. Os SNPs foram genotipados por PCR-RFLP (*MspI*) e PCR *TaqMan* (*HhaI* e *DraI*). As análises de associação foram feitas através de três abordagens: caso-controle populacional (Regressão Logística Condicional), método baseado em famílias (*software* FBAT aplicado para cada *locus* individualmente e em haplótipos) e análises dimensionais (ANCOVA). Foi calculado o desequilíbrio de ligação (DL) entre os SNPs e estimativas de haplótipos (programa MLocus). As análises de farmacogenética foram realizadas através do *mixed-effect model* (MEM). As frequências genótípicas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, concordando com o descrito na literatura para o mesmo grupo étnico, assim como as frequências gênicas. Uma associação do SNP *MspI* com sintomas de desatenção foi detectada através da análise dimensional, em que a presença do alelo G contribuiu para o aumento nos escores desses sintomas ($p=0,027$). As análises mostraram também uma tendência de associação com o polimorfismo *DraI* em alguns grupos de pacientes, definidos por diferentes características clínicas, através do FBAT (individualmente e em haplótipos) e das análises dimensionais ($0,049 < p < 0,098$), em que o alelo T estaria

contribuindo para a etiologia da doença. Ainda, o estudo de farmacogenética detectou um efeito do alelo A gerado pelo SNP *HhaI* na melhora dos sintomas de desatenção após o tratamento com MPH, especificamente na amostra comunitária ($p=0,036$). É possível sugerir, então, que o gene *ADRA2A* atue efetivamente na etiologia do TDAH na nossa população, principalmente através de um efeito modificador do polimorfismo *MspI* sobre sintomas de desatenção. O provável efeito do SNP *DraI* em diferentes grupos de sintomas deve ser investigado em maior detalhe. Porém, se verdadeiro, possivelmente seja um efeito na suscetibilidade ao TDAH de modo geral, atuando principalmente de forma independente do *MspI* apesar do elevado DL. Acreditamos que o resultado positivo obtido para o *HhaI* também se deva ao alto DL com o *MspI*, refletindo o efeito deste na resposta ao tratamento com MPH, observado previamente na mesma amostra. Análises adicionais como, por exemplo, estudos funcionais e interações gene-gene serão essenciais para aprimorar ainda mais a compreensão acerca da influência do gene *ADRA2A* na etiologia do TDAH, em geral e na nossa população.

Palavras-Chave: TDAH, *ADRA2A*, associação, polimorfismos, farmacogenética, metilfenidato.

ABSTRACT

Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) is one of the most common psychiatric disorders of childhood and adolescence. It is considered a complex disease, with an estimated heritability of 76%. There are strong evidences implicating the noradrenergic system in the origin of ADHD. Considering that $\alpha 2A$ is the most prevalent noradrenergic receptor in prefrontal cortex, region involved in the disease, the gene that codifies this receptor (*ADRA2A*) seems to be interesting for genetic studies. Previous studies from our group investigated the *MspI* (rs1800544) polymorphism in this gene and found association of GG genotype mainly with inattentive symptoms. Moreover, the group detected an effect of G allele on the improvement of inattentive symptoms under treatment with methylphenidate (MPH). The aim of the present work was to achieve a better understanding on *ADRA2A* influence in the etiology of ADHD in our population, analyzing besides *MspI* both *HhaI* (rs1800545) and *DraI* (rs553668) polymorphisms, in a study of association and pharmacogenetics. The total sample consists of 478 children and adolescents with ADHD and their biological parents, obtained from Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Outpatient Program (ProDAH) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and from public schools of Porto Alegre, and 100 controls, also obtained in schools. The SNPs were genotyped by PCR-RFLP (*MspI*) and PCR-TaqMan (*HhaI* e *DraI*). Association analyses were performed using three approaches: populational case-control (Conditional Logistic Regression), family-based method (FBAT software applied to individual *locus* and haplotypes) and dimensional analyses (ANCOVA). Linkage disequilibrium (LD) among SNPs and haplotypes estimates were calculated (MLocus program). Pharmacogenetic analyses were performed through *mixed-effect model* (MEM). Genotype frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium, agreeing with those described in the literature for the same ethnic group, as well as allele frequencies. An association between *MspI* SNP and inattentive symptoms was detected by dimensional analyses, the presence of G allele contributing to the increase of scores in these symptom dimension ($p=0.027$). Analyses also showed a trend for association with *DraI* polymorphism in some groups of patients, defined by different clinical characteristics, through FBAT (individually and in haplotypes) and dimensional analyses ($0.049 < p < 0.098$), in which T allele would be contributing to ADHD etiology. The pharmacogenetic study detected an effect of *HhaI* A allele on the improvement of

inattentive symptoms under treatment with MPH, specifically in community sample ($p=0.036$). Then, it is possible to suggest that *ADRA2A* gene effectively influences ADHD etiology in our population, mainly through a modifier effect caused by *MspI* on inattentive symptoms. The possible effect of *DraI* in different groups of symptoms should be further investigated. However, if true, it will probably be a susceptibility effect on ADHD in general, acting in most part independently of *MspI* despite the high LD. We believe the positive result obtained for *HhaI* can also be explained by the high LD with *MspI*, reflecting the effect of this SNP on the response to MPH treatment, previously observed in the same sample. Additional analyzes such as functional studies and gene-gene interactions will be essential to further increase the comprehension about *ADRA2A* involvement in ADHD etiology, in general and in our population.

Keywords: ADHD, *ADRA2A* gene, association, polymorphisms, methylphenidate, pharmacogenetic.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	9
1.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E EPIDEMIOLÓGICA DO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE (TDAH).....	10
1.2 NEUROBIOLOGIA E ETIOLOGIA	12
1.3 O GENE <i>ADRA2A</i> E O TDAH	15
1.3.1 Estudos de associação	16
1.3.2 Estudos de farmacogenética	19
1.3.3 <i>ADRA2A</i> atuando como um bloco funcional.....	21
1.4 ESTUDOS DE GWAS E CNVS.....	22
CAPÍTULO II – JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	26
CAPÍTULO III – ARTIGO EM PREPARAÇÃO	29
CAPÍTULO IV – DISCUSSÃO	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXOS	71
ANEXO A – Termo de Consentimento Pós-Informação	71
ANEXO B – Resoluções do Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA.....	74
ANEXO C – Pareceres da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa	77

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>ADRA2A</i>	Gene do receptor adrenérgico α 2A
<i>ADRA2C</i>	Gene do receptor adrenérgico α 2C
<i>ANKK1</i>	<i>Ankyrin repeat and kinase domain containing 1</i>
APA	<i>American Psychiatric Association</i>
<i>CDH13</i>	Gene da caderina 13
<i>CHRNA7</i>	Gene do receptor colinérgico nicotínico 7 alfa polipeptídeo
CNVs	<i>Copy Number Variants</i>
<i>COMT</i>	Gene que codifica a enzima catecol-O-metiltransferase
CPF	Córtex pré-frontal
<i>CYP2C19</i>	Gene do citocromo P450 enzima 2C19
<i>CYP2C9</i>	Gene do citocromo P450 enzima 2C9
<i>CYP2D6</i>	Gene do citocromo P450 enzima 2D6
<i>DAT1</i>	Gene do transportador de dopamina
DL	Desequilíbrio de Ligação
<i>DRD2</i>	Gene do receptor D2 de dopamina
<i>DRD4</i>	Gene do receptor D4 de dopamina
<i>DRD5</i>	Gene do receptor D5 de dopamina
DSM-IV	Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais – 4ª edição
<i>DBH</i>	Gene da enzima dopamina-beta-hidroxilase
<i>GFOD1</i>	Gene da glicose-frutose oxido-redutase de domínio 1
<i>GRM7</i>	Gene do receptor metabotrópico de glutamato 7
GWAS	<i>Genome-Wide Association Study</i>
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HRR	<i>Haplotype Relative Risk</i>
MEM	<i>Mixed-Effect Model</i>
MPH	Metilfenidato
<i>NET1</i>	Gene da proteína transportadora de noradrenalina
<i>PARK2</i>	Gene da proteína 2 de Parkinson
ProDAH	Programa de Déficit de Atenção e Hiperatividade
QTDT	Quantitativo do Teste de Desequilíbrio de Transmissão
<i>SLC9A9</i>	Gene do transportador de soluto, família 9, subfamília A, membro 9
SNAP-IV	<i>Swanson, Nolan and Pelham Scale - version IV</i>
SNP	Polimorfismo de base única
TC	Transtorno de Conduta
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade
TDAH-D	Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade subtipo Desatento
TDT	Teste de Desequilíbrio de Transmissão
TOD	Transtorno de Oposição Desafio
UTR	Região não traduzida
VNTR	Número variável de repetições em <i>tandem</i>

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, com prevalência mundial estimada em torno de 5% das crianças em idade escolar (Polanczyk *et al.*, 2007a). A proporção de meninos e meninas afetados varia de 3:1 a 9:1 em amostras clínicas, diminuindo-se a diferença em amostras comunitárias (Faraone *et al.*, 2006). A principal característica do TDAH é um padrão persistente de desatenção e/ou hiperatividade/impulsividade, que é mais freqüente e severo do que é normalmente esperado 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 (ver Tabela 1); e de acordo com a presença de, no mínimo, seis sintomas em um ou nos dois grupos, três tipos clínicos são reconhecidos conforme a prevalência desses 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). Cerca de dois terços das crianças com TDAH têm um diagnóstico de outro transtorno psiquiátrico. As comorbidades mais prevalentes são transtorno de oposição desafio (TOD) e transtorno de conduta (TC), cuja ocorrência varia entre 20 e 40% e aumenta o risco de piores prognósticos nos pacientes com TDAH. Transtornos de ansiedade e transtornos de humor também são bastante comuns nas crianças e adolescentes afetados por essa doença (Smith *et al.*, 2009; Stergiakouli & Thapar, 2010).

Tabela 1: Critérios diagnósticos do DSM-IV para o Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (APA, 1994).

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

A. Ou (1) ou (2)

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

Desatenção:

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

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

Hiperatividade:

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

Impulsividade

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

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

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

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

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

Codificar com base no tipo:

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

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

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

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

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. A prevalência estimada do transtorno em adultos é em torno de 2,5% (Simon *et al.*, 2009). Segundo Stergiakouli & Thapar (2010), os níveis de hiperatividade e impulsividade tendem a diminuir, enquanto que a desatenção é mais persistente. As comorbidades mais frequentes são os transtornos de humor e de ansiedade, podendo ocorrer também abuso de substâncias (Rohde *et al.*, 1999; Grevet *et al.*, 2006; Newcorn, 2008). Além disso, a presença do TDAH em adultos está associada com altas taxas de acidentes de trânsito, alta frequência de troca de empregos e maiores taxas de separações e divórcio (Kieling & Rohde, 2011), o que aumenta o impacto negativo da doença não só para o indivíduo e sua família, mas também para a sociedade.

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; Genro *et al.*, 2012). 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; Arnsten & Pliszka, 2011). Diversos estudos neuropsicológicos têm mostrado que crianças com TDAH apresentam desempenho prejudicado em funções cognitivas e executivas como atenção, percepção, planejamento, organização e memória de trabalho, além de falhas na inibição comportamental, processos claramente relacionados ao lobo frontal e áreas subcorticais (Arnsten & Li, 2005; Makris *et al.*, 2009; Tripp & Wickens, 2009). É possível também que os prejuízos neuropsicológicos do TDAH estejam relacionados com as falhas na sinalização de recompensas tardias, sendo estas secundárias aos déficits nos processos motivacionais (Sonuga-Barke, 2005).

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 dos mesmos. Entre os fármacos comumente utilizados no tratamento do TDAH está o metilfenidato (MPH), 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 recaptção no neurônio pré-sináptico (Biederman & Spencer, 1999; Masellis *et al.*, 2002; Madras *et al.*, 2005). Esta diminuição da recaptção catecolaminérgica ocorre principalmente devido à alta afinidade do MPH pelo transportador de dopamina. No entanto, em áreas em que a concentração do transportador de noradrenalina é maior, o MPH bloqueia este transportador, também influenciando a captação de ambas, noradrenalina e dopamina (Moron *et al.*, 2002; Arnsten & Li, 2005; Berridge *et al.*, 2006). O efeito do MPH nas vias das catecolaminas resulta na melhora de função do córtex pré-frontal (CPF), sendo esta melhora sugerida por alguns estudos como a ação mais importante do MPH (Berridge *et al.*, 2006).

A etiologia das particularidades neurobiológicas do TDAH também não está 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; Neale *et al.*, 2008; Genro *et al.*, 2010). 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) and Banerjee *et al.* (2007) sugerem que diversos fatores ambientais podem estar relacionados ao TDAH, incluindo baixo peso ao nascer, prematuridade, consumo materno de álcool pré-natal, estresse materno, dieta materna pobre, algumas toxinas presentes durante o período pré-natal ou neonatal, e diferentes adversidades psicossociais. O tabagismo materno durante a gestação, entretanto, é um dos fatores com maior número de evidências sugerindo associação, em que o consumo de tabaco pela mãe aumentaria em média duas vezes a chance da criança ter TDAH (Banerjee *et al.*, 2007). Apesar do número considerável de achados positivos, a relação exata desse fator com o TDAH ainda suscita discussões: o tabagismo poderia estar influenciando na predisposição ao transtorno como um fator ambiental, ou pelo fato de que mães que fumam

teriam um componente genético comum às etiologias do TDAH e do abuso ou dependência de drogas. O estudo de Thapar *et al.* (2009) conduzido com crianças concebidas através de técnicas de fertilização *in vitro*, avaliou o risco de desenvolvimento de TDAH associado com o uso de nicotina durante a gestação. A hipótese dos autores foi de que, se o tabagismo materno na gravidez fosse um fator de risco verdadeiro para o TDAH, a associação seria observada independentemente de mães e filhos serem geneticamente relacionados. Os dados obtidos corroboraram esta hipótese, indicando uma associação entre o tabagismo na gravidez e o baixo peso ao nascer, independentemente de mãe e filho serem aparentados. No entanto, para os sintomas de TDAH, a magnitude da associação foi significativamente maior quando havia essa relação biológica entre mãe e filho do que quando não havia, sugerindo que efeitos genéticos também atuam na associação entre o tabagismo materno e o risco de desenvolvimento do TDAH.

A herdabilidade estimada de 76%, a partir de diferentes estudos de gêmeos, sugere um forte componente genético no TDAH (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; Banaschewski *et al.*, 2010; 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 investigações realizadas até o momento sobre a genética do TDAH, incluindo as varreduras genômicas, mostraram resultados divergentes e, portanto, estão longe de serem conclusivos (Franke *et al.*, 2009; Neale *et al.*, 2010b; Genro *et al.*, 2012). Em contraste, muitos estudos com genes candidatos têm produzido evidências implicando diferentes genes na etiologia do transtorno (Faraone *et al.*, 2005; Stergiakouli & Thapar, 2010).

Os efeitos da noradrenalina e dopamina são mediados através de interações com diversos tipos de receptores que demonstram diferentes afinidades para essas catecolaminas, e costumam ser finalizados através da recaptção feita por transportadores ou pela metabolização via enzimas específicas (Arnsten & Pliszka, 2011). Portanto, genes de diferentes sistemas de neurotransmissores que codificam transportadores, receptores ou enzimas são muito investigados no TDAH, como por exemplo, o *DAT1* (gene do transportador de dopamina), o *DRD2* (gene do receptor D2 de dopamina), o *DRD4* (gene do receptor D4 de dopamina), *DRD5* (gene do receptor D5 de dopamina), o *DBH* (gene

que codifica a enzima dopamina-beta-hidroxilase), genes dos receptores adrenérgicos α_{2A} (*ADRA2A*) e α_{2C} (*ADRA2C*), a *COMT* (gene que codifica a enzima catecol-O-metiltransferase), entre outros (Gizer *et al.*, 2009; Neale *et al.*, 2010b; Genro *et al.*, 2012).

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 (Biederman & Faraone, 2005; Faraone & Mick, 2010; Stergiakouli & Thapar, 2010), este trabalho enfocou o sistema noradrenérgico. De acordo com Arnsten & Pliszka (2011), a noradrenalina atua principalmente em receptores do tipo α_1 -, α_2 - e β -, tendo alta afinidade pelos receptores α_2 e baixa afinidade pelos tipos α_1 e β (Arnsten, 2000). Segundo Belfer *et al.* (2005), os receptores adrenérgicos α_2 são amplamente distribuídos no sistema nervoso central e periférico. Eles são receptores de superfície celulares acoplados a proteína-G para as catecolaminas endógenas, adrenalina e noradrenalina, mediando parte dos diversos efeitos biológicos desses neurotransmissores.

Os receptores α_2 são subdivididos em α_{2A} , α_{2B} e α_{2C} . Estes subtipos estão localizados pré-sinápticamente nos neurônios noradrenérgicos, em dendritos ou terminais de axônio, e pós-sinápticamente nos neurônios que recebem sinapses noradrenérgicas (Arnsten & Pliszka, 2011). Entre os receptores α_2 , os do subtipo α_{2A} são os mais prevalentes no CPF, uma das áreas cerebrais supostamente envolvidas no TDAH, e parecem ser essenciais para o funcionamento adequado desta região (Wang, M. *et al.*, 2007; Sanchez-Mora *et al.*, 2012). Nos estudos de Andrews & Lavin (2006) and Sanchez-Mora *et al.* (2012), os autores afirmam que o MPH potencializa a atividade noradrenérgica através de um aumento da ativação de receptores adrenérgicos do tipo α_{2A} , entre outros efeitos, corroborando a ideia de que a noradrenalina atua principalmente através desta classe de receptores (Arnsten, 2000). Belfer *et al.* (2005) especulam que algumas das variações interindividuais nas respostas são explicadas por variações genéticas nos receptores α_2 , que acarretam mudanças na quantidade ou na estrutura dos receptores. Todas estas evidências indicam o gene que codifica o receptor adrenérgico α_{2A} (*ADRA2A*) como um bom candidato para estudos moleculares com o TDAH.

O *ADRA2A* é um gene sem introns, com aproximadamente 5kb e localizado na região cromossômica 10q25.2 (Lario *et al.*, 1997). Vários polimorfismos já foram descritos neste gene; no entanto, três deles são os mais estudados na literatura (Figura 1). O principal é um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) localizado na região promotora, -1291C>G (rs1800544), identificado por Lario *et al.* (1997) e conhecido como *MspI*, já que cria um sítio de restrição para a enzima *MspI*. Os dois outros polimorfismos presentes no gene também estudados no TDAH 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 também receberam essa denominação por criarem sítios de restrição às enzimas *HhaI* e *DraI*, respectivamente.



Figura 1: Representação esquemática da estrutura do gene *ADRA2A* e os três polimorfismos estudados (modificado de Park *et al.*, 2005). A porção que codifica a proteína é mostrada como um retângulo preto, na parte central da figura. A linha espessa mostra as regiões 5' e 3'UTR, onde estão localizados os polimorfismos *HhaI* e *DraI*, respectivamente. A linha fina mostra na extremidade 5' a região promotora do gene onde está localizado o polimorfismo *MspI*, e na extremidade 3' a sua região terminal. As trocas de base que geram cada SNP também estão indicadas.

1.3.1 Estudos de associação

O primeiro estudo de associação do gene *ADRA2A* com o TDAH foi realizado por (Xu *et al.*, 2001). Em uma amostra de pacientes e seus pais biológicos e utilizando o Teste de Desequilíbrio de Transmissão (TDT), um método de estudo baseado em famílias, os autores verificaram que nenhum dos alelos do *MspI* foi preferencialmente transmitido dos pais ao filho afetado, não detectando, portanto, associação com o TDAH. O trabalho de Deupree *et al.* (2006) também não detectou associação para esse polimorfismo, usando dois diferentes métodos baseados em famílias (FBAT e Gene Hunter2 TDT). Resultados

negativos foram ainda observados em dois outros estudos, ambos utilizando a análise do TDT (Wang, B. *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2008).

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 próxima 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/impulsividade mostraram associação com esse alelo. No trabalho de Stevenson *et al.* (2005), através de um método baseado em famílias utilizando o programa *Transmit*, houve transmissão significativa do alelo G, mas apenas na subamostra de pacientes que apresentavam comorbidade com Transtorno de Leitura. Esses resultados controversos impedem que se possa confirmar a influência do gene *ADRA2A*, e particularmente do SNP *MspI*, na etiologia do TDAH em diferentes populações.

A possibilidade de associação desse polimorfismo com o TDAH já foi investigada na nossa população. Roman *et al.* (2003), em uma amostra de 92 pacientes e seus pais biológicos, através do método baseado em família *Haplotype Relative Risk* (HRR), não detectaram nenhum dos alelos do *MspI* sendo preferencialmente transmitido. Mas, por meio de análises dimensionais, detectaram associação do genótipo GG com aumento no número de sintomas na dimensão de desatenção e combinada (desatenção + hiperatividade/impulsividade). Em investigação posterior, estes mesmos autores, com uma amostra nova de 128 pacientes, confirmaram a associação do genótipo GG com um maior escore de sintomas de desatenção, estes obtidos através de uma escala de sintomas amplamente utilizada, a *Swanson, Nolan and Pelham Scale - version IV* (SNAP-IV; Roman *et al.*, 2006). Em outro estudo do grupo, Schmitz *et al.* (2006) investigaram uma amostra composta por 100 crianças e adolescentes afetados por TDAH do subtipo desatento, seus respectivos pais biológicos e 100 controles. Embora nenhuma associação tenha sido detectada através do HRR, a comparação caso-controle mostrou que a homozigose para o alelo G aumentou em 3,78 o risco para este subtipo da doença. Esses resultados estão de acordo com os trabalhos de Park *et al.* (2005) and Stevenson *et al.* (2005), e sugerem que, em nossa população, o gene *ADRA2A*, e especificamente o polimorfismo *MspI*, está relacionado ao TDAH, particularmente à dimensão de desatenção.

Estudos para o SNP *DraI* também são controversos, existindo na literatura tanto resultados positivos como negativos. No trabalho de Park *et al.* (2005), através do TDT, foi observada uma transmissão preferencial do alelo T 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. O estudo de Wang, B. *et al.* (2006) não encontrou associação do *DraI* com o TDAH através do TDT. Já o trabalho de Deupree *et al.* (2006), detectou um efeito do alelo C em três diferentes fenótipos do TDAH (desatenção, hiperatividade e total) quando analisado pelo FBAT; no entanto, quando analisado pelo Gene Hunter2 TDT o resultado significativo não se repetiu. Em 2008, Cho *et al.* (2008), através da análise do TDT, encontraram transmissão preferencial do alelo C. É interessante ressaltar que os resultados positivos desses dois últimos trabalhos se referem ao alelo C, contrastando com o estudo de Park *et al.* (2005), o que pode estar relacionado a diferenças nas frequências alélicas e genótípicas em diferentes populações Wang, B. *et al.* (2006) e Cho *et al.* (2008).

Para o SNP *HhaI* ainda não foi descrito nenhum resultado positivo. No trabalho de Park *et al.* (2005), uma análise de desequilíbrio de ligação (DL) identificou entre os haplótipos mais frequentes combinações onde tanto o alelo G como o alelo A do SNP *HhaI* estão em DL com o alelo G do *MspI*, o que fez o autor sugerir os dois como possíveis alelos de risco, de acordo com a análise utilizada: pelo método baseado em 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 para o *HhaI* isoladamente, entretanto, faz com que nenhum dos dois alelos possa ser confirmado ou excluído como alelo de suscetibilidade até agora. O trabalho de Deupree *et al.* (2006) também não detectou associação com esse polimorfismo. É importante mencionar que ambos os trabalhos realizaram uma análise de haplótipos com *MspI*, *HhaI* e *DraI*. Através do TDT, Park *et al.* (2005) observaram que a transmissão do haplótipo G/G/T (alelos presentes nos três SNPs citados acima, respectivamente) foi estatisticamente significativa no grupo que incluía pacientes do subtipo combinado e no grupo que incluía pacientes dos subtipos combinado e predominantemente desatento de TDAH. Já através de uma avaliação dimensional por QTDT, tanto os escores dos sintomas de desatenção como de hiperatividade/impulsividade mostraram associação com o haplótipo G/G/T na direção de

aumentar o risco para o TDAH, enquanto que o haplótipo C/G/C mostrou associação com os escores dos sintomas de desatenção e com o de hiperatividade/impulsividade, mas na direção de diminuir o risco para o TDAH (Park *et al.*, 2005). Já no trabalho de Deupree *et al.* (2006) foi verificada associação com o haplótipo C/G/C (SNPs *MspI*, *HhaI* e *DraI*, respectivamente) aumentando o risco para TDAH em geral, contrastando com o resultado encontrado por Park *et al.* (2005). Além dos trabalhos acima citados, Waldman *et al.* (2006), realizaram um estudo com enfoque diferenciado, relacionando os polimorfismos do gene *ADRA2A* com o funcionamento neuropsicológico. Neste estudo, os autores investigaram um possível efeito moderador e mediador dos déficits de função executiva sobre a associação entre o *ADRA2A* e o TDAH, verificando uma associação mais robusta com o transtorno em crianças com pior desempenho cognitivo.

1.3.2 Estudos de farmacogenética

Sabe-se que psicoestimulantes são muito eficientes no tratamento de TDAH, mas há também uma grande variabilidade na resposta dos pacientes ao fármaco. Um relato de caso realizado por Tan-kam *et al.* (2013) destaca a importância de estudos de farmacogenética no tratamento de TDAH. Esse estudo investigou um menino de seis anos de idade com diagnóstico deste transtorno. Foi prescrito a ele 5mg de MPH duas vezes ao dia; no entanto o paciente teve múltiplos efeitos adversos. A genotipagem para os genes *CYP2D6*, *CYP2C19* e *CYP2C9* foi então realizada. Estes genes codificam, respectivamente, as enzimas 2D6, 2C19 e 2C9, que fazem parte da família do citocromo P450 (CYP), responsável pela metabolização do MPH. A atividade das isoenzimas de CYP é grandemente influenciada por polimorfismos genéticos, podendo ser reduzida ou aumentada. De acordo com os alelos presentes, e a atividade enzimática correspondente, os pacientes podem ser categorizados em quatro fenótipos: metabolizadores extensos, metabolizadores intermediários, metabolizadores pobres ou lentos e metabolizadores ultrarápidos. Entre os genes CYP, aqueles citados acima são os mais investigados em farmacogenética por serem altamente polimórficos. Após sua análise, o genótipo do paciente foi identificado como *CYP2D6**2/*10, codificador de isoformas da enzima consistentes com o predito fenótipo metabolizador intermediário da enzima 2D6. Com base nesses achados os médicos ajustaram a dose de MPH para 2,5mg ao dia. Nesta nova dose o

paciente teve uma boa resposta sem qualquer efeito adverso. Dada sua possível aplicação clínica, cada vez mais estudos sobre o efeito da composição genética dos indivíduos na maneira como eles respondem às drogas estão sendo desenvolvidos com diversos genes candidatos ou de suscetibilidade do TDAH.

Alguns trabalhos têm investigado se existe associação entre o gene *ADRA2A*, principalmente o polimorfismo *MspI*, e a resposta clínica ao tratamento com MPH. O primeiro estudo deste tipo foi realizado na nossa população por Polanczyk *et al.* (2007b), com o objetivo de avaliar essa possível associação em 106 crianças e adolescentes com TDAH. Os pacientes, que nunca haviam utilizado a medicação antes, tiveram o MPH de curta ação administrado em doses crescentes até que nenhuma melhora clínica adicional fosse detectada ou até que efeitos adversos ocorressem. Os sintomas foram avaliados no início do tratamento, um e três meses depois, para verificar se houve melhora. O resultado encontrado nesse trabalho foi um efeito do alelo G na melhora dos sintomas de desatenção com o tratamento durante os três meses. Nesse mesmo grupo de pesquisa, da Silva *et al.* (2008) estudaram 59 crianças e adolescentes com TDAH do subtipo desatento. O resultado encontrado corrobora o trabalho anterior, em que indivíduos com o alelo G tiveram significativamente escores mais baixos de desatenção no primeiro mês de tratamento do que indivíduos sem o alelo G. Em ambos os estudos a escala utilizada para avaliar melhora clínica foi a SNAP-IV. Um estudo recente analisou, em uma amostra de adultos com TDAH, os três principais polimorfismos do gene *ADRA2A* (*MspI*, *HhaI* e *DraI*). No entanto, não foi encontrado efeito significativo dos polimorfismos na resposta ao MPH, também avaliada através da variação de escores da SNAP-IV entre pré e pós-tratamento, com um mês de intervalo (Contini *et al.*, 2011).

Estudos de farmacogenética com o *ADRA2A* em outras populações consideraram este gene tanto isoladamente como em interação com outros genes. O trabalho de Cheon *et al.* (2009) avaliou o polimorfismo *MspI* em 114 crianças e adolescentes com TDAH em uma população coreana. O resultado encontrado nesse trabalho foi que uma melhor resposta ao tratamento com MPH, medido pela *ADHD Rating Scale*, foi observada em indivíduos portadores do genótipo GG, quando comparados aos pacientes com os genótipos CG e CC. Em outra população coreana (n=103) detectou-se efeitos significantes de interação na resposta ao MPH entre os genótipos do polimorfismo de número variável de repetições em *tandem* (VNTR) localizado no exon 3 do gene *DRD4* (genótipo 4/4) com

o SNP *DraI* do *ADRA2A* (grupo de genótipo CT+TT). Da mesma forma, efeitos significantes de interação dos genótipos do *DraI* (CT+TT) com cada um dos dois polimorfismos estudados no gene da proteína transportadora de noradrenalina (*NET1*), 3081A>T (grupo de genótipo AT+TT) e G1287A (grupo de genótipo GA+AA) foram encontrados. Apesar de não ficar claro no texto se as interações observadas se associam a melhor ou pior resposta, esses resultados sugerem que os genes envolvidos nos sistemas dopaminérgico e noradrenérgico podem interagir para formar preditores importantes da resposta em curto prazo para o MPH (Hong *et al.*, 2012).

Poucos estudos de farmacogenética utilizam doses de placebo juntamente com doses de medicação. Utilizando esta abordagem o estudo de (Froehlich *et al.*, 2011) detectou para o polimorfismo *MspI* um efeito em escores no domínio hiperativo/impulsivo. Os indivíduos homozigotos para o alelo G exibiram níveis mais elevados de sintomas no grupo placebo; o aumento das doses de MPH, ao contrário do esperado, continuaram associadas a níveis mais elevados.

Os estudos apresentados fornecem evidências consistentes de que o gene *ADRA2A* influencia na resposta ao tratamento com MPH, em mais de uma população. Porém, a literatura existente sobre farmacogenética do TDAH sugere que este fenótipo é influenciado por inúmeros polimorfismos, cada um exercendo um efeito pequeno (Polanczyk *et al.*, 2010). Portanto, é necessário o estudo de outras variantes genéticas, tanto neste como em outros genes.

1.3.3 *ADRA2A* atuando como um bloco funcional

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) sugerem 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. Neste trabalho, os autores analisaram nove marcadores quanto à sua funcionalidade, incluindo os polimorfismos *MspI* e *DraI*. O bloco haplotípico proposto 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 DL com a variante em estudo. É

importante mencionar que três outros polimorfismos descritos no gene *ADRA2A* (rs18000034, rs1800035 e rs1800036) estão localizados em regiões codificadoras, sendo variantes não sinônimas, com potencial de produzir diferenças funcionais na proteína (Feng *et al.*, 1998). Porém, análises populacionais realizadas por Park *et al.* (2005) não identificaram esses SNPs na amostra estudada, o que fez esses autores sugerirem que são de fato mutações raras; portanto, não influenciariam o bloco haplotípico funcional.

Small *et al.* (2006) realizaram um estudo no qual identificaram 16 SNPs do gene *ADRA2A* organizados em 17 haplótipos. Alguns polimorfismos detectados nesse trabalho foram os mesmos avaliados nos estudos citados anteriormente. No entanto, para outros SNPs não há como ter certeza disso, já que os autores não referenciaram o código de identificação do polimorfismo (rs), indicando apenas a posição e a troca de base, padrão oposto ao utilizado nos demais trabalhos. Apesar desta dificuldade, o trabalho de Small *et al.* (2006) enfatiza o possível papel funcional do polimorfismo *DraI*. Quantificando a expressão de RNAm do *ADRA2A* obtida a partir do gene completo, os maiores níveis foram associados a 4 diferentes haplótipos, 3 deles contendo o alelo T deste SNP. Entretanto, a presença deste alelo em três outros haplótipos, além dos acima citados, pode representar uma heterogeneidade genética significativa.

As dúvidas sobre a funcionalidade das variantes estudadas contribuem para a falta de entendimento sobre o seu real efeito no TDAH, sendo necessário, portanto, realizar mais estudos com os diferentes polimorfismos para elucidar de que forma ocorre a influência do gene *ADRA2A* na etiologia do transtorno de forma geral, e em aspectos mais específicos, tais como resposta ao tratamento farmacológico.

1.4 ESTUDOS DE GWAS E CNVS

Nos últimos anos vem sendo utilizada uma nova e interessante abordagem de investigação, o *Genome-Wide Association Study* (GWAS). Estudos de GWAS investigam centenas a milhares de SNPs em uma amostra, sendo necessária uma análise estatística específica e muito rigorosa. O principal objetivo desta abordagem é identificar variantes genéticas que a priori não teriam uma hipótese biológica para serem consideradas em estudos moleculares, diferentemente da abordagem de genes candidatos ou de

suscetibilidade. Alguns GWAS têm sido bem sucedidos na identificação de variantes associadas com doenças complexas como obesidade, degeneração macular, diabetes tipo I e tipo II, doença de Crohn, câncer de próstata e doença celíaca (Lasky-Su *et al.*, 2008).

Até agora cinco GWAS com amostras de crianças e adolescentes com TDAH foram realizados. Entre os estudos que utilizaram a definição categórica do transtorno, nenhuma das análises para os diferentes SNPs alcançou o nível de significância exigido por essa metodologia, sendo $p < 5 \times 10^{-8}$ (Lasky-Su *et al.*, 2008; Neale *et al.*, 2008; Mick *et al.*, 2010; Neale *et al.*, 2010a; Hinney *et al.*, 2011). No entanto, ao ser utilizada uma definição quantitativa do TDAH, os resultados para dois SNPs nos genes da caderina 13 e da glicose-frutose oxido-redutase de domínio 1 (*CDH13* e *GFOD1*, respectivamente) alcançaram o nível de significância. Ainda, para vários outros SNPs presentes no gene do transportador de soluto, família 9, subfamília A e membro 9 (*SLC9A9*) foi obtida uma significância nominal, sugerindo um papel para este gene no transtorno. Um estudo de farmacogenética do MPH utilizando a metodologia GWAS foi desenvolvido por (Mick *et al.*, 2008). A associação mais instigante observada nesta investigação foi com o gene do receptor metabotrópico de glutamato 7 (*GRM7*), uma vez que este gene é expresso em estruturas cerebrais previamente associados com TDAH. Além disso, dois SNPs dentro do *NET1* mostraram resultados significativos. Esses achados corroboram o envolvimento do sistema noradrenérgico na resposta ao MPH, sugerindo também um possível efeito de genes glutamatérgicos.

Ao justificar os resultados negativos encontrados os autores desses estudos reforçam o que foi citado anteriormente, a hipótese de que os fatores de risco para o TDAH têm um pequeno efeito e que são necessárias amostras grandes para identificar genes de suscetibilidade de modo consistente. Além disso, Neale *et al.* (2008) and Mick *et al.* (2010) sugerem que a heterogeneidade das amostras poderia estar direcionando para a perda de resultados positivos. Neale *et al.* (2008) ainda sugerem explicações alternativas, que incluiriam a possível interação de variantes genéticas, seja dentro ou entre genes, e sua interação com fatores de risco ambientais. A influência de outros tipos de polimorfismos genéticos, como os polimorfismos de número de cópias, ou *copy number variants* (CNVs), também é sugerida.

CNVs incluem inserções, duplicações ou deleções e englobam segmentos genômicos relativamente grandes (embora não haja uniformidade no tamanho utilizado

para definir ou identificar esse tipo de variação, pode-se falar em 1kb a vários Mb). Apesar de ser uma classe frequente de polimorfismos do genoma humano, a maioria dos CNVs já descritos são raros (Franke *et al.*, 2009; Mills *et al.*, 2011; Sanders *et al.*, 2012). Eles podem ser transmitidos através das gerações ou podem surgir por mutações novas. Um estudo recente, que enfocou seu possível papel como moduladores potenciais de vias biológicas na evolução do genoma humano, sugere que esses polimorfismos podem modular alterações sutis em vias específicas, e podem tornar-se fixados em determinadas populações (Poptsova *et al.*, 2013).

Embora sejam fontes de variação genética, estudos têm demonstrado que os CNVs contribuem para algumas doenças de neurodesenvolvimento como deficiência intelectual, esquizofrenia e autismo (Elia *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2010; Langley *et al.*, 2011). O primeiro trabalho a investigar esses polimorfismos em TDAH foi o de Elia *et al.* (2010); apesar de não encontrar excesso na amostra de pacientes em comparação com a amostra controle, foi possível observar uma concentração notável dos mesmos em genes de neurodesenvolvimento. Já o estudo de Williams *et al.* (2010) demonstrou que CNVs grandes e raros são significativamente mais comuns em crianças com TDAH do que naquelas sem a doença. CNVs raros herdados em *locus* previamente relacionados a este (como por exemplo, *DRD5* e microduplicação 15q13) ou outros transtornos do desenvolvimento também foram observados (Lionel *et al.*, 2011). Evidências mostrando a implicação dessa região cromossômica foram posteriormente sugeridas pelo trabalho de Williams *et al.* (2012); esses autores verificaram que duplicações abrangendo o gene do receptor colinérgico nicotínico 7 alfa polipeptídeo (*CHRNA7*), localizado no cromossomo 15q13.3, estavam associadas com TDAH. Os resultados obtidos por Jarick *et al.* (2012) sugerem que CNVs presentes no gene da proteína 2 de Parkinson (*PARK2*) podem contribuir para a susceptibilidade genética ao TDAH, uma vez que foram significativamente mais frequentes nas crianças com este transtorno do que em controles. Usualmente, mutações e CNVs em *PARK2* são conhecidas por estarem associadas com a doença de Parkinson.

Embora ainda bastante iniciais, os resultados obtidos nos estudos de GWAS e com CNVs vêm se mostrando importantes na geração de novas hipóteses biológicas, nunca antes consideradas nas análises de associação. Outra característica desses estudos é que praticamente nenhum resultado positivo se refere a regiões cromossômicas de, ou

variações genéticas presentes em, *locus* tradicionalmente investigados nas abordagens de genes candidatos, incluindo o *ADRA2A*. Contudo, através da biologia de sistemas, o que se verifica é que vários destes genes “clássicos” interagem com componentes dessas “novas” rotas biológicas. Esses achados podem representar o desenvolvimento de novas metodologias de estudo, e um avanço no entendimento da função de genes já aceitos como de suscetibilidade em diferentes doenças, como no TDAH. Por outro lado, a dificuldade em se obter resultados estatisticamente significativos com as abordagens mais modernas sugere a importância de dar continuidade aos clássicos estudos de associação com genes candidatos.

JUSTIFICATIVA

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. Mesmo quando detectada associação, ainda não se sabe qual o efeito exato da mesma, devido à complexidade e etiologia multifatorial desse transtorno. 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 investigações com esse gene sejam realizadas, com a finalidade de compreender melhor o seu envolvimento na etiologia do TDAH. Em nossa população, este *locus*, especificamente o polimorfismo *MspI*, tem mostrado associação, particularmente sobre sintomas de desatenção. Porém, dúvidas sobre a funcionalidade do polimorfismo impedem que se afirme que esse SNP seja o responsável pelo efeito do gene na etiologia do TDAH. Assim, justifica-se uma análise mais detalhada do gene *ADRA2A* na nossa amostra.

OBJETIVOS

GERAL

Aprofundar o estudo do gene *ADRA2A* na nossa população, verificando a possibilidade de associação em crianças e adolescentes com o TDAH, tanto para o SNP *MspI* como para os SNPs *HhaI* e *DraI*.

ESPECÍFICOS

1. Analisar a possibilidade de associação entre o TDAH e os polimorfismos *MspI*, *HhaI* e *DraI*, isoladamente e em haplótipos, tanto na amostra total como em subgrupos de pacientes definidos por diferentes características clínicas, através das abordagens caso-controle, método baseado em famílias e análises dimensionais.
2. Verificar o grau de desequilíbrio de ligação (DL) entre os três polimorfismos;
3. Avaliar a influência desses SNPs na resposta clínica durante o tratamento com MPH em crianças e adolescentes com TDAH.

CAPÍTULO III – ARTIGO EM PREPARAÇÃO

JOURNAL OF NEURAL TRANSMISSION

Reinforcing the role of adrenergic α 2A receptor gene in the etiology of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder

Ferraz, GR¹; Akutagava-Martins, GC¹; Guimarães, APM¹; Denardin, D²; Silva, TL²; Pianca, T²; Faraone, SV³; Polanczyk, G⁴; Zeni, CP²; Chazan, R²; Schmitz, M²; Rohde, LA²; Hutz, MH¹; Roman, T¹.

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

²ADHD Outpatient Clinic Child and Adolescent Psychiatric Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

³Department of Psychiatry, Upstate Medical University, Syracuse, New York.

⁴Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, University of São Paulo.

Keywords: ADHD, *ADRA2A* gene, association, polymorphisms, methylphenidate, pharmacogenetics.

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: 55-51-3308-9795

Fax: 55-51-3308-7311

E-mail: tatiana.roman@ufrgs.br

Abstract

Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) is one of the most common psychiatric disorders, affecting 5.29% of children and adolescents worldwide. It is considered a complex disease, caused by different factors. The estimated heritability of 76% suggests a strong genetic component. The aim of this study was to investigate the association between ADHD and three SNPs of adrenergic α 2A receptor gene (*ADRA2A*): -1291C>G (*MspI*, rs1800544); -262G>A (*HhaI*, rs1800545); and 1780 C>T (*DraI*, rs553668). The sample was obtained from hospital and community sets, and consisted of 478 ADHD children and adolescents with biological parents and 100 controls. The hypothesis of association was verified through case-control, family-based (FBAT applied to individual *locus* and haplotypes) and dimensional approaches. Pharmacogenetic analyses on the response to methylphenidate (MPH) treatment were performed using a mixed-effects model (MEM). Dimensional analyses detected an association with *MspI*, since mean SNAP-IV scores in inattentive dimension were higher in carriers of G allele ($p=0.027$). A trend for association with *DraI* was seen in some groups of patients, defined by different clinical characteristics, through FBAT (individually and in haplotypes) and dimensional analyses ($0.049 < p < 0.098$). MEM detected a significant interaction effect between the presence of *HhaI* A allele and treatment over time for the SNAP-IV inattentive scores during 1 month of treatment ($p=0.036$). Our findings indicate that *ADRA2A*, through *MspI*, actually acts as a modifier gene in inattentive symptoms, the *HhaI* result probably being reflective of a high linkage disequilibrium (LD) between them. The possible effect of *DraI* in different groups of symptoms should be further investigated.

Keywords: ADHD, *ADRA2A* gene, association, polymorphisms, methylphenidate, pharmacogenetic.

Introduction

Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) is one of the most common psychiatric disorders affecting children and adolescents, with a worldwide-pooled prevalence of 5.29% (Polanczyk et al. 2007a). It is a complex and heterogeneous disorder (Genro et al. 2012) characterized by a persistent pattern of inattention and/or hyperactivity/impulsivity, which is more frequent and severe than is usually expected in individuals at a comparable level of development (Wallis et al. 2008). This pattern of symptoms puts children at risk of education failure and disrupts family, teacher and peer relationships (Stergiakouli and Thapar 2010). Around two thirds of children with ADHD have a diagnosis of another psychiatric disorder, being oppositional defiant disorder (ODD) and conduct disorder (CD) among the most prevalent comorbidities (Stergiakouli and Thapar 2010; Smith et al. 2009). The presence of other psychiatric conditions increases the negative impact of the disease not only for individuals but also to their families (Biederman 2007).

The etiology of ADHD is not yet completely understood (Genro et al. 2012). Nevertheless, it is well known as a multifactorial disorder caused by the confluence of different types of factors (ie, genetic, biological, environmental), each one having a small effect on its vulnerability through additive and interactive effects (Biederman and Faraone 2005). Neuroimaging studies suggest that it is a frontal-striatum-cerebellum disease, since these regions present lower volume and activity in patients with this pathology (Castellanos et al. 2002; Curatolo et al. 2009; Arnsten and Pliszka 2011). These areas are primarily innervated by catecholamines, thus the main biochemical theories proposed for explaining its symptoms are based on these neurotransmitters (Arnsten and Li 2005; Curatolo et al. 2009). Evidence from pharmacological studies also corroborates the involvement of this pathway: among drugs commonly used in the treatment of ADHD, methylphenidate hydrochloride (MPH) is the most widely prescribed psychostimulant in clinical practice. This drug has high affinity for dopamine transporter; the blockade of this protein by MPH reduces the reuptake of dopamine from synaptic cleft, which is largely accountable for its effect on symptoms improvement. However, in areas where the concentration of noradrenaline transporter is greater, MPH blocks this protein, influencing the reuptake of both noradrenaline and dopamine, thus involving both neurotransmitter

systems in its therapeutic action (Moron et al. 2002; Arnsten and Li 2005; Berridge et al. 2006; Wilens 2008).

Additional neurobiological evidences implicating noradrenergic circuits in ADHD emphasizes the importance of $\alpha 2A$ noradrenergic receptors. Although noradrenaline acts primarily on receptors $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - e β -, it has the highest affinity for $\alpha 2$ -receptors (Arnsten 2000; Arnsten and Pliszka 2011). In the study of Andrews and Lavin (2006) and Sanchez-Mora et al. (2012), the authors claim that MPH enhances the noradrenergic activity through increasing the activation of $\alpha 2A$ adrenergic receptors among other effects. Considering different types of $\alpha 2$ receptors, $\alpha 2A$ is the most prevalent noradrenergic receptor in prefrontal cortex (Wang et al. 2007). The observations made by some authors suggesting the improvement in prefrontal cortex function achieved with MPH can be the most important effect of this drug (Berridge et al. 2006) further supports the involvement of $\alpha 2A$ in ADHD symptomatology.

The high mean heritability of 76% estimated for ADHD shows it is among the most heritable psychiatric disorders and has stimulated a great number of molecular studies (Faraone et al. 2005). Given neurobiological evidences, the gene that codifies the adrenergic $\alpha 2A$ receptor (*ADRA2A*) seems to be a good candidate for these investigations (Faraone and Mick 2010; Stergiakouli and Thapar 2010). *ADRA2A* is an intronless gene located on chromosome 10q25.2 (Lario et al. 1997). Several polymorphisms have been described in this *locus*, however, three of them are the most studied in the literature. The main is a single nucleotide polymorphism (SNP) located in the promoter region at position -1291 (rs1800544), identified by Lario et al. (1997). The change C>G creates a restriction site for *MspI* endonuclease, thus this SNP is usually referred as *MspI*. The other two commonly studied SNPs are the -262 G>A (rs1800545), located at 5' untranslated region (UTR) (Park et al. 2005) and the 1780 C>T (rs553668), located at 3' UTR (Hoehe et al. 1988). These polymorphisms are also named according to the restriction sites they created, being *HhaI* e *DraI*, respectively.

MspI was the first polymorphism investigated in association studies between *ADRA2A* gene and ADHD, and positive (Roman et al. 2003, 2006; Schmitz et al. 2006; Park et al. 2005; Stevenson et al. 2005) as well as negative (Xu et al. 2001; Deupree et al. 2006; Cho et al. 2008; Wang et al. 2006) results have been described. In our population, this SNP has been associated to inattentive symptoms by both categorical and dimensional

approaches. Roman et al. (2003) detected association by dimensional analysis between GG genotype and increased number of both inattention and combined (inattention plus hyperactivity/impulsivity) symptoms in ADHD children and adolescents. In a subsequent investigation, these same authors, with a new, independent sample, confirmed the association of the GG genotype with higher scores in inattentive dimension (Roman et al. 2006). In another study from our group, Schmitz et al. (2006), using a case-control comparison, showed that homozygosity for the G allele increased the risk for ADHD inattentive subtype (ADHD-I). A role for G allele in inattention and hyperactivity/impulsivity symptom dimensions was also verified by Park et al. (2005), while Stevenson et al. (2005) observed a preferential transmission of this allele to ADHD probands who presented also reading disability.

Studies for *DraI* are controversial. Park et al. (2005), through the Transmission Disequilibrium Test (TDT), verified preferential transmission of the T allele towards children with ADHD. Nonetheless, Deupree et al. (2006) detected preferential transmission of the C allele when using another family-based method, the FBAT, although when Gene Hunter2 TDT was applied the positive results did not hold. Cho et al. (2008) also observed preferential transmission of the C allele, while Wang et al. (2006) found no association at all. Only two studies investigated *HhaI* in ADHD, both of them showing no evidence of association (Deupree et al. 2006; Park et al. 2005).

The role of genetic polymorphisms in different aspects of pharmacological treatment has also been addressed in ADHD, although in a fewer number of studies. Some of these have investigated the effect of polymorphisms of noradrenergic genes on treatment with MPH, including *ADRA2A MspI* (Hong et al. 2012). Polanczyk et al. (2007b) assessed a possible association in ADHD children and adolescents from our population. A significant interaction effect on the improvement of inattentive scores between the presence of *MspI* G allele and treatment with MPH over time during 3 months of treatment was detected. The same research group corroborated this previous work in a sample of ADHD-I children and adolescents (da Silva et al. 2008). Individuals with the G allele had significantly lower inattentive scores after one month of MPH treatment than individuals without the G allele. Two studies in other populations involving *MspI* were performed. First, Cheon et al. (2009) verified that a better response to MPH treatment was observed for subjects carrying GG genotype than other genotypes. Second, Froehlich et al. (2011)

detected a main effect on hyperactive/impulsive domain scores, with G homozygous displaying higher symptom levels on placebo and continuing at these higher levels as MPH doses increased.

Although quite numerous, the investigations performed to date on ADHD molecular genetics are far from conclusive (Genro et al. 2012). Regarding *ADRA2A* gene, there are doubts about the true causal polymorphism and which allele would be the risk one in each SNP. Also, the observed effect seems to be specifically to inattentive symptoms in our population, although to ADHD *per se* in other samples. Therefore, further studies with different polymorphisms are necessary to elucidate how *ADRA2A* gene influences ADHD. The aim of this investigation is to contribute to a better understanding of the role of this *locus* on disease etiology, through evaluating the possibility of association between three polymorphisms (*MspI*, *HhaI* and *DraI*) and ADHD. We also seek to verify, by a pharmacogenetic approach, if these polymorphisms can influence the response to MPH treatment.

Material and Methods

Sample

The sample consisted of 478 ADHD children and/or adolescents and their biological parents and 100 control children and/or adolescents. Individuals were evaluated at different stages through the Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Outpatient Program (ProDAH) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). This is the teaching hospital of the Federal University of Rio Grande do Sul. Part of the sample (n=378 patients and biological parents) were obtained directly from ProDAH, while the remaining affected families (n=100) and control individuals came from public schools from the city of Porto Alegre.

The patients obtained from hospital 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); b) discussion of the derived diagnosis in a clinical committee; c) clinical evaluation of ADHD and comorbidities according to DSM-IV. In case of a diagnostic discrepancy in

the three stage procedure, preference was given to the diagnoses derived from clinical interviews. After this evaluation, patients were defined according to the three clinical subtypes recognized by DSM-IV: inattentive, hyperactive/impulsive and combined (APA 1994). A cognitive evaluation based on cube and vocabulary subtests of Weschler Intelligence Scale – Third edition (WISC-III; Weschler 1991) was performed for estimating IQ. Data regarding the Swanson, Nolan and Pelham Scale - version IV (SNAP-IV), a scale that measures symptoms scores in the areas of inattention, hyperactivity/impulsivity, opposition and total (Swanson et al. 2001), were also collected from part of the sample. Social-demographic information was systematically collected from parents. In addition, subjects' overall functioning was assessed by the Clinical Global Assessment Scale (CGAS; Shaffer et al. 1983). The CGAS is a widely used measure of child and adolescent global functioning and has adequate psychometric properties.

Regarding the sample obtained from community, only ADHD patients from predominantly inattentive subtype (ADHD-I) were included. These are defined according to the presence of at least four inattentive symptoms and at most three hyperactivity/impulsivity symptoms. Teachers were initially trained to detect symptoms of inattention in students, using the SNAP-IV scale. Individuals identified as possible cases were invited to the diagnostic stage of the study, performed at ProDAH following the same three stage procedure described above. The control probands matched by gender and age were selected at the same school grades the patients came from, also based on teachers' scores in the SNAP-IV, and invited to diagnostic phase; 100 controls without ADHD, mental retardation and psychosis were included in the sample. Social-demographic information was also collected. More details in the enrollment of both patients and controls can be seen in Schmitz et al. (2006).

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

Pharmacological intervention and clinical evaluation

Patients were treated according to the ProDAH's protocol. Doses of short-acting MPH were augmented until there was no further clinical improvement or there were limiting side effects (Rohde 2002). MPH was administered preferentially twice daily (8

AM and noon), but an extra dose at 5–6 PM was allowed for children needing continuous coverage during evenings. Psychiatrists were blinded to patients' genotypes. Mean dose of MPH prescribed was around 0.63-0.65mg/kg/day. The parental-rated subscale of the SNAP-IV was the primary outcome measure. Clinical assessment were performed by child psychiatrists at baseline before medication and after 1 and 3 months of MPH treatment for hospital patients, and after 1 month of MPH treatment for community probands. More details on pharmacological intervention can be seen in Polanczyk et al. (2007b) and da Silva et al. (2008).

Genotyping

A 5 mL blood sample was collected from each patient (and their biological parents, whenever possible) and each control. DNA was extracted from whole blood by a salting out method according to Lahiri and Nurnberger (1991). The *MspI* polymorphism (-1291C>G, rs1800544) was amplified using PCR conditions, followed by digestion with *MspI* restriction endonuclease and genotyping in a polyacrylamide gel stained with ethidium bromide (adapted from Lario et al. 1997). The other two polymorphisms, *HhaI* and *DraI* (-262A>G; rs1800545 and 1780C>T; rs553668, respectively), were genotyped by TaqMan allelic discrimination assays (Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System), according to manufacturer's suggested protocol.

Statistical analyses

Genotype frequencies were calculated for each *locus*. Allele frequencies and Hardy-Weinberg equilibrium were obtained by direct analysis of genotype frequencies and chi-square test.

Association hypothesis between *ADRA2A* markers and ADHD was verified by both case-control and family-based approaches. For the first, we applied conditional logistic regression analysis to compare genotype frequencies between probands and controls in the context of potential confounders. These were defined on the basis of conceptual analyses of the literature and by using a broad statistical definition (association with both the study factor and outcome for a $p \leq 0.20$). Family-based analyses of association were performed by FBAT 2.0.2 software (Laird 2000). Through this methodology 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. Haplotype FBAT analyses were also applied. The characterization of linkage disequilibrium (LD) and the estimation of haplotypes comprising the three *ADRA2A* polymorphisms were performed with MLocus software (Long 1999).

Dimensional analyses were performed by ANCOVA, comparing parental SNAP-IV scores in different dimensions among patients of different genotype groups. Potential confounders included as covariates were defined as stated above.

Analyses of the effect of different genotypes on the efficacy of the treatment (measure by SNAP-IV dimensions) were performed using a mixed-effects model (MEM), which provides a flexible framework for the analysis of repeated measures while accounting for missing data (eg, loss to follow-up; Gibbons et al. 1993; Mallinckrodt et al. 2001; Gueorguieva and Krystal 2004). We restricted analyses to patients with SNAP-IV baseline scores higher than 1 on subscales to allow sufficient room for improvement, as described previously (Polanczyk et al. 2007b). Independent factors included in all models were treatment over time, group assignment (defined as the presence of the rare allele), and the interaction between these factors. All possible interactions were tested, but no significant interactions were dropped in a final model using a backward elimination procedure. Potential confounders to be entered in models were defined as explained. The best covariance structure fitting the data was selected based on the one with the lowest Akaike Information Criterion (AIC) value.

SPSS version 19.0 software was used to calculate genotype frequencies and for case-control, dimensional and pharmacogenetic analyses. A two-tailed significance level of 5% was set in all analyses.

Results

Sample characteristics

The data set included in this study consisted of 478 patients coming from families with both (n=345, 72.2%), only one (n=115, 24.1%) and no (n=18, 3.8%) biological parents available, and 100 control individuals. The sample from hospital (n=378) consisted of predominantly male patients (79.1%) from European descent (86.6%), with a mean age of 10.1 (± 3.0) years and mean IQ of 92.5 (± 13.8). Combined subtype of the disorder was the most prevalent (65.6%), followed by predominantly inattentive subtype (25.2%) and

predominantly hyperactive/impulsive subtype (6.8%). ODD was the most common comorbidity (37.8%), but anxiety disorders (27.9%), CD (14.4%) and mood disorders (13.4%) were also frequent. Demographic and clinical characteristics of the sample from community (n=100 for both cases and controls) are described elsewhere (Schmitz et al. 2006). Hospital and community patients differ significantly only on age, ethnicity, ADHD subtype composition and SNAP-IV scores (data not shown, but available upon request).

Allele and genotype frequencies

Genotype and allele frequencies for both patients and controls were calculated from unrelated European descent individuals, although subjects from African and mixed descent were also included in other analyses. In probands, the estimated frequencies for *MspI*, *HhaI* and *DraI* most common alleles were, respectively, 0.65 (C allele), 0.87 (G allele) and 0.79 (C allele). For the same polymorphisms, the most frequent genotypes were 0.44 (CC), 0.76 (GG) and 0.63 (CC), respectively. The most common alleles in controls were C (0.69), G (0.90) and C (0.76) for *MspI*, *HhaI* e *DraI*, respectively, while the most frequent genotypes were CC (0.47), GG (0.79) and CC (0.59) for the same polymorphisms [the frequencies for *MspI* was previously calculated and presented in Schmitz et al. (2006)]. Allele and genotype frequencies were in agreement with the literature for the analyzed ethnic group, and genotype frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium. The unreported data can be showed if requested.

Categorical and dimensional association analyses

The hypothesis of association was initially tested by case-control analyses for *HhaI* and *DraI* SNPs, using the subjects from community sample. For this purpose, conditional logistic regression was performed considering the homozygous for the putative risk allele versus other genotypes, the same approach used by Schmitz et al. (2006) when testing association with *MspI* polymorphism in this sample. The risk genotypes were AA for *HhaI* and TT for *DraI* (estimated frequencies 0.02 and 0.08, respectively). There was no evidence of association between the two analyzed polymorphism and ADHD-I (*HhaI*: p=0.296, OR=0.71, 95% confidence interval (CI) =0.37 – 1.35; *DraI*: p=0.858, OR=1.108, CI=0.36 – 3.40), even after adjusting for potential confounders (agoraphobia, IQ estimate and ethnicity for *HhaI* and agoraphobia for *DraI*).

For family-based approach, the FBAT was first performed for each *locus* individually, considering four different subgroups of patients: total hospital sample, combined subtype, inattentive subtype, and ADHD + ODD/CD. The results are presented in Table 1. This approach showed no statistically significant differences between transmitted and non-transmitted alleles for both *MspI* and *HhaI*, with p values ranging from 0.122 to 1.000. However, borderline p values were observed for *DraI* at three subgroups: total hospital sample, combined subtype and ADHD + ODD/CD (p value equal 0.07, 0.049 and 0.056, respectively; see Table 1), T allele being slightly more transmitted than C allele.

LD analyses considering the three SNPs revealed that the polymorphisms are in strong LD (D' for pairwise LD ranging from 0.947 to 1.000, with $p < 0.001$). The hypothesis of association considering *ADRA2A* haplotypes was also tested through FBAT. The program estimated six different haplotypes. However, only those with frequency greater than or equal to 0.1 were included in the test, resulting in three haplotypes. Analyses were performed for the same groups of patients described above, being presented in Table 2. There was no evidence of association between any possible haplotype and inattentive subtype. For the other three subgroups we found borderline p values for an increased transmission of G/G/T haplotype (0.074, 0.053 and 0.063 for total hospital sample, combined subtype and ADHD + ODD/CD, respectively). In the last subgroup, a trend for under transmission of C/G/C haplotype was also observed ($p = 0.081$).

Dimensional analyses performed for inattention, hyperactivity/impulsivity, opposition and total SNAP-IV scores in patients from hospital are presented in Table 3. An association with inattentive symptoms was detected for *MspI*, since the mean SNAP-IV scores in this dimension were higher in probands of CG and GG genotypes than in CC homozygous ($p = 0.027$). No significant differences in hyperactive/impulsive, oppositional and total SNAP-IV scores were found. Regarding *HhaI*, there was no evidence of association with any SNAP-IV dimension (p values ranging from 0.744 to 0.972). For *DraI* we detected a trend in inattentive and oppositional dimensions (p values of 0.098 and 0.072, respectively); the presence of T allele seems to increase the mean for inattentive scores, while its homozygosity seems to decrease the mean for oppositional dimension. The other two sub-scores showed no associations at all. Dimensional analyses were also performed in probands from the community, comparing SNAP-IV inattentive scores

between patients from different *MspI*, *HhaI* and *DraI* genotype groups. There was no evidence of association for any of these polymorphisms, with p values ranging from 0.161 for to 0.483.

Pharmacogenetic analyses

Considering the low frequency of homozygous genotypes for the less frequent alleles, the statistical analyses for the MEM were applied considering carriers (homozygous plus heterozygous) and non-carriers of rare alleles. This approach resulted in the following genotype groups: CC and CG/GG for *MspI*; GG and AG/AA for *HhaI*; CC and CT/TT for *DraI*.

For hospital sample, 240 patients that fulfilled inclusion criteria integrated the MEM analyses. IQ, ADHD subtype, comorbid conditions, methylphenidate dosage, previous use of medication, demographic characteristics, and baseline scores on measures assessed were tested to identify potential confounders according to statistical definition. As result, each comparison between polymorphisms and SNAP-IV subscales considered different covariates. SNAP-IV baseline scores of each dimension were included as a conceptual covariate. No significant effects of the *ADRA2A* polymorphisms on the response to MPH evaluated through the SNAP-IV scores during 3 months of treatment were detected, with p values ranging from 0.168 to 0.922.

For community sample, 59 patients agreed to participate in the treatment trial and this analysis was performed only for *HhaI* and *DraI*, since pharmacogenetic analysis for *MspI* in these probands was previously performed (da Silva et al. 2008). The same demographic and clinical variables tested in hospital sample were analyzed here to identify potential confounders through statistical definition, but no one was detected (data not shown, but available upon request). We included SNAP inattentive baseline scores as a conceptual covariate in both *HhaI* and *DraI* analyses.

The MEM analyses detected a significant effect in carriers of *HhaI* A allele on SNAP-IV inattentive scores over time. In the model that included treatment over time, the presence of *HhaI* A allele, SNAP-IV inattentive baseline scores and the interaction among these factors, no individual effects of treatment over time during 1 month ($F_{(1,56)}=3.915$; $p=0.053$) and of the presence of *HhaI* A allele ($F_{(1,55)}=0.002$; $p=0.964$) were detected. However, the effect of SNAP-IV inattentive baseline scores was statistically significant

($F_{(1,55)}=85.665$; $p<0.001$). A significant interaction effect between the presence of *HhaI* A allele and treatment over time for the SNAP-IV inattentive scores during 1 month of treatment was also verified ($F_{(1,56)}=4.626$; $p=0.036$), as shown in Figure 1. No third-order interactions were significant. The covariance structure with the lowest AIC value was the Toeplitz. For *DraI*, MEM analyses did not find any significant effect ($F_{(1,56)}=0.030$; $p=0.864$; full data not shown).

Discussion

Previous studies suggested that *ADRA2A* might be important for ADHD etiology in our population, either as susceptibility or a modifier gene, particularly in inattentive dimension. With the purpose of extending the comprehension of this possible effect of *ADRA2A*, the present study examined the possibility of association between ADHD in both referred and non referred patients and three polymorphisms, *MspI*, *HhaI* and *DraI*, the last two not formerly studied in our population. Our assumptions were: 1) case-control approach would detect association for at least one of the two SNPs newly studied (*HhaI* e *DraI*), given previous association with *MspI* and the strong LD among all these polymorphisms; 2) family-based analyses for each *locus* individually would reveal no significant results, since no study from our group have found positive results with this approach; 3) by family-based analyses for haplotypes it was expected the haplotype containing G allele of *MspI* was preferentially transmitted; 4) dimensional analysis would replicate our results for *MspI* and would identify association with *DraI*, since some studies of the literature have observed significant results with this SNP and given the strong LD between both SNPs; 5) pharmacogenetics analyses would replicate our previous results with *MspI*.

Nevertheless, in the present study we verified: 1) no positive results by case-control approach; 2) borderline P values for the *DraI* polymorphism suggesting preferential transmission of T allele, detected by family-based analyses in total hospital sample, combined subtype and ADHD + ODD/CD probands; 3) a trend for an over transmission of G/G/T haplotype in the same subgroups of patients and for an under transmission of C/G/C haplotype in ADHD + ODD/CD subjects, detected by family-based analyses; 4) only in probands from the hospital, association with the presence of G allele at *MspI* and the increase of inattentive symptoms, and a trend for *DraI*, the T allele slightly increasing

inattentive symptoms and TT genotype slightly decreasing scores in oppositional dimension, through dimensional analyses; 5) an effect of the presence of *HhaI* A allele and treatment over time for SNAP-IV inattentive scores during 1 month of treatment with MPH by pharmacogenetics analyses, but only in patients from the community.

The negative results partially obtained for *MspI* in association analyzes corroborate our previous findings (Roman et al. 2003; Schmitz et al. 2006) and agree with other reports (Xu et al. 2001; Deupree et al. 2006; Wang et al. 2006; Cho et al. 2008) that also used family-based analyses, but disagrees with the study of Park et al. (2005) and Stevenson et al. (2005). A possible explanation for these negative results would be a statistical type II error occurred due to the method of analyses. This possibility is well applied to family-based association analyses, especially those using TDT and/or FBAT software. Such methodologies are very used in ADHD literature, and fit to our mixed population due to its strength against population stratification aroused by different ethnic origins in a sample (Eley and Rijdsdijk 2005). However, family-based approaches are very stringent in the selection of families to be included in the analyses. Thus, sample size tends to decrease dramatically, making hard the detection of significant results in the case of small effect genes, as in ADHD. The use of other approaches, as case-control and dimensional analyses, could circumvent this issue, decreasing the chance of a false negative. In fact, we were able to detect association when applying these methodologies in both previous (Roman et al. 2003, 2006; Schmitz et al. 2006) and present work. Specifically, the results showed herein, as expected, reinforce the role of *ADRA2A MspI* as a modifier of ADHD inattentive dimension in our population; through G allele, this gene seems to contribute increasing the severity of the symptoms in this dimension. The reduced size of the community sample, independently analyzed due to differences in SNAP-IV scores, could have avoided the replication of the *MspI* results obtained for hospital patients in dimensional analyses.

The works from Park et al. (2005) and Deupree et al. (2006) corroborate our negative results in all association analyses for *HhaI* polymorphism, suggesting that this SNP is not playing a direct role in the predisposition to, or severity of, ADHD in our sample. The non-significant findings in family-based methods could also be due to the stringency of this approach, however, the lack of association observed in both case-control and dimensional analyses indicate that the results are not false negative. Because A allele was investigated by Park et al. (2005) as the risk one when performing dimensional

analysis, and since this approach was able to evidence our more consistent findings with *ADRA2A*, we chose A allele for definition of risk genotype in case-control method. It is important to note that both A and G alleles were considered risk alleles for other analyses in previous reports (Park et al. 2005; Deupree et al. 2006). However, we do not believe the use of G allele for definition of risk genotype would evidence an association in our sample.

As for *DraI* polymorphism, most of our analyses showed a trend for association; if it has reached significance, these findings would agree with those described by Wang et al. (2006) but differ from that observed in other studies (Park et al. 2005; Deupree et al. 2006; Cho et al. 2008). A possible explanation for these results may be the sample size, an assumption that would be consistent with their detection through dimensional analyses only in patients from hospital, more numerous than community patients. Ioannidis et al. (2003) point to the number of subjects used in the study of candidate genes, as they require large samples to achieve adequate statistical power and replicable results. Nonetheless, many published studies of this type have employed relatively small samples (Gizer et al. 2009; Faraone and Mick 2010; Stergiakouli and Thapar 2010). To circumvent this limitation, and also in order to elucidate the discrepant results found in several investigations, Gizer et al. (2009) conducted a meta-analysis for the most common genes investigated in ADHD. Regarding *ADRA2A*, there was no significant effect for any of the three studied SNPs (OR values ranging from 0.92 to 1.00). However, for *DraI* polymorphism a significant heterogeneity in effect size among studies was observed, which may have contributed to the negative findings of the meta-analysis. Of note, some positive reports for this SNP have suggested the C allele or CC genotype as the risk ones (Deupree et al. 2006; Cho et al. 2008), different from what has been indicated by Park et al. (2005). Each of these investigations analyzed different subgroups of patients or specific aspects of ADHD phenotype, through several approaches, thus making hard the actual comparison among them.

A peculiarity of our *DraI* results is that diverse methodologies pointed to a non significant association of T allele with different groups of symptoms, or through different levels of specificity: using FBAT the effect would apply to ADHD overall, since it would appear in patients with various characteristics (that is, total hospital sample, combined subtype and ADHD + ODD/CD); the dimensional analysis would show a specificity to inattention (the relation of TT genotype with lower opposition scores would reflect the effect seen through FBAT in ADHD + ODD/CD). Considering these putative *DraI* effects

and the ones reported for *MspI*, we suggest that we are possibly dealing with different influences according to the site where each SNP is located, being a susceptibility effect caused by *DraI* (since the sample size issue seems to have a larger impact), and a modulation effect by *MspI* (as already discussed), possible to be detected and discerned by the methodologies used herein. A distinct role of promoter/5' UTR and 3' UTR regions has been suggested. Both are functionally relevant to the control of gene expression, although by different mechanisms (transcription factors in promoter/5' UTR and micro RNAs in 3' UTR); the comparable level of selective constraints indicate they are nevertheless equally important (Mu et al. 2011). Thus, it is plausible that polymorphisms in each gene region would substantially, though differently, affect gene function and its involvement with the diseases. This would be also in agreement with the supposition of *MspI* and *DraI* affecting diverse sets of symptoms. One issue to consider is the high LD pattern observed between *MspI* and *DraI*, namely G and T alleles. This would be inconsistent with results in FBAT, but consistent with results in dimensional analysis. We suggest that the effect of *DraI* *per se* would appear in the first because *MspI* influence is not suitable to this methodology. In the context of *MspI* modifier effect, evidenced by dimensional tests, the weaker impact of *DraI* would be masked due to the high LD pattern, being driven to inattentive dimension. Such relation would not hold in case-control approach due to sample size, not large enough to show up very small effects.

The hypothesis we proposed can be supported by functional studies with *ADRA2A*. The consequences of each polymorphism for receptor signaling, as determined in transfected cells, included changes in G-protein coupling, desensitization, and G-protein-receptor kinase-mediate phosphorylation (Small and Liggett 2001). However, their functionality is not clear yet. According to Belfer et al. (2005), either *MspI*, *HhaI* or *DraI* seem to have an effect on gene expression. Due to the high LD pattern comprising all polymorphisms, these authors suggest *ADRA2A* acts as a "functional block", enough to capture the information content even when the supposed functional *locus* was not included. Despite these conclusions, the possible role of *DraI*, namely the T allele, in gene function has been emphasized. Investigating 16 SNPs (including *DraI*) in haplotypes and relating them to the expression of mRNA *ADRA2A* obtained from the whole gene sequence, Small et al. (2006) observed that the highest levels of mRNA were associated with four different haplotypes, three of them containing the T allele at that site. However, the presence of this allele in three other haplotypes besides the above mentioned can represent a source of

significant genetic heterogeneity, preventing definitive conclusions on this matter. In spite of all considerations, though, we cannot rule out that the tendency for *DraI* in FBAT and dimensional analyses may have been observed simply by chance.

Although the findings for the three variants pointed to different directions, regarding their putative involvement in ADHD etiology in our population, it is possible that each one's effect depends on several polymorphisms acting together, or, alternatively, that the effect of one SNP resulted to be determined by another, because *ADRA2A* LD pattern. Thus, we performed FBAT haplotype analyses, whose findings corroborated the ones observed for each variant individually also through this approach, that is, negative results for *MspI* and *HhaI*, and a tendency for association with *DraI* in different groups of symptoms. Even though the stringency of the method could have contributed to false negatives, we believe the actual effect detected for *MspI* in other tests depends not only on G allele, but on its presence in homozygosity, condition not sustained in haplotype analyses. It is interesting to note that the non significant increased transmissions in total hospital, combined subtype and ADHD + ODD/CD patients refer to G/G/T haplotype, which includes putative risk alleles at both *MspI* and *DraI* (first and third positions, respectively). In a quite complementary way, the haplotype tending to under transmission in the last group of subjects was C/G/C, thus without risk alleles at those sites.

Pharmacogenetic analyses for *MspI* in patients from hospital did not sustain the effect of G allele on the improvement of inattentive symptoms with MPH treatment previously verified by our group (Polanczyk et al. 2007b). This could be due to some undetected heterogeneity of the sample, which may have directed to the loss of positive findings. Nevertheless, as suggested (Colhoun et al. 2003), this is not an unexpected observation in studies trying to replicate previous results in molecular genetics field, since true heterogeneity in gene-response associations might exist among samples. These following investigations may also lack power to reveal the same previous significant findings. On the other hand, this was the first pharmacogenetic study to evaluate the three *ADRA2A* polymorphisms in children and adolescents with ADHD. It is interesting to note that an investigation with the same SNPs in a sample of ADHD adults from our population also did not verify any statistically significant effect on the response to MPH (Contini et al. 2011). We believe the positive result seen for *HhaI* in patients from the community can be reflective of previous *MspI* findings (da Silva et al. 2008); due to the strong LD between

both SNPs, *HhaI* can be acting only as a marker without any influence on clinical response to MPH. As for *DraI*, it probably does not alter this phenotype as well.

A limitation of our study we cannot fail to mention is the number of statistical tests conducted. However, it is important to consider that most of the analytical methods used by molecular studies, although widespread, do not seem to be entirely appropriate for investigation of the influence of small effect genes in multifactorial diseases, what drives the use of several methodologies. This emphasizes the need for future studies to implement new strategies able to provide sufficient statistical power to detect such small effects in candidate genes (Franke et al. 2009; Gizer et al. 2009; Stergiakouli and Thapar 2010).

We conclude that the effect of *ADRA2A* gene on ADHD etiology in our population, particularly on the symptoms of inattention, seems to be actually related to *MspI* polymorphism. This statement can be supported by our previous (Roman et al. 2003, 2006; Schmitz et al. 2006; Polanczyk et al. 2007b; da Silva et al. 2008) and present results, indicating that this SNP, through G allele, can be modulating the development of symptoms in that area, being also probably related to its improvement with MPH treatment. Regarding the other two polymorphisms, while *HhaI* seems to have no influence neither in the susceptibility to the disease nor the improvement of symptoms under pharmacotherapy, it is possible that *DraI* does have an effect on ADHD susceptibility, independent in some groups of symptoms and linked to *MspI* in others. Further association studies considering several *ADRA2A* polymorphisms and using different methodologies, as well as functional studies will be crucial to clarify this issue.

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).

Conflict of interest: Dr Rohde was on the speakers' bureau and/or acted as consultant for Eli-Lilly, Janssen-Cilag, Novartis and Shire in the last 3 years (less than US\$ 10.000 per year and reflecting less than 5% of his gross income per year). He also received travel awards (air tickets and hotel) for taking part of two child psychiatric meetings from Novartis and Janssen-Cilag in 2010. The ADHD and Juvenile Bipolar Disorder Outpatient

Programs chaired by him received unrestricted educational and research support from the following pharmaceutical companies in the last 3 years: Abbott, Bristol-Myers Squibb, Eli-Lilly, Janssen-Cilag, Novartis and Shire. All other authors report no biomedical financial interest or potential conflict of interest.

References

- Andrews GD, Lavin A (2006) Methylphenidate increases cortical excitability via activation of alpha-2 noradrenergic receptors. *Neuropsychopharmacology* 31 (3):594-601. doi:1300818 [pii]
- 10.1038/sj.npp.1300818
- American Psychiatric Association (1994) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 4 edn., 4. ed. (DSM-IV). Washington D. C: American Psychiatric Association.
- Arnsten AF (2000) Through the looking glass: differential noradrenergic modulation of prefrontal cortical function. *Neural Plast* 7 (1-2):133-146. doi:10.1155/NP.2000.133
- Arnsten AF, Li BM (2005) Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biol Psychiatry* 57 (11):1377-1384. doi:S0006-3223(04)00933-3 [pii]
- 10.1016/j.biopsych.2004.08.019
- Arnsten AF, Pliszka SR (2011) Catecholamine influences on prefrontal cortical function: relevance to treatment of attention deficit/hyperactivity disorder and related disorders. *Pharmacol Biochem Behav* 99 (2):211-216. doi:S0091-3057(11)00035-9 [pii]
- 10.1016/j.pbb.2011.01.020
- Belfer I, Buzas B, Hipp H, Phillips G, Taubman J, Lorincz I, Evans C, Lipsky RH, Enoch MA, Max MB, 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 (1):12-20. doi:10.1007/s10038-004-0211-y
- Berridge CW, Devilbiss DM, Andrzejewski ME, Arnsten AF, Kelley AE, Schmeichel B, Hamilton C, Spencer RC (2006) Methylphenidate preferentially increases catecholamine neurotransmission within the prefrontal cortex at low doses that enhance cognitive function. *Biol Psychiatry* 60 (10):1111-1120. doi:S0006-3223(06)00533-6 [pii]
- 10.1016/j.biopsych.2006.04.022
- Biederman J (2007) Advances in the neurobiology of ADHD. *CNS Spectr* 12 (4 Suppl 6):6-7
- Biederman J, Faraone SV (2005) Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet* 366 (9481):237-248. doi:S0140-6736(05)66915-2 [pii]
- 10.1016/S0140-6736(05)66915-2
- Castellanos FX, Lee PP, Sharp W, Jeffries NO, Greenstein DK, Clasen LS, Blumenthal JD, James RS, Ebens CL, Walter JM, Zijdenbos A, Evans AC, Giedd JN, Rapoport JL (2002) Developmental trajectories of brain volume abnormalities in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *JAMA* 288 (14):1740-1748. doi:joc20194 [pii]
- Cheon KA, Cho DY, Koo MS, Song DH, Namkoong K (2009) Association between homozygosity of a G allele of the alpha-2a-adrenergic receptor gene and methylphenidate response in Korean children and adolescents with attention-

deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 65 (7):564-570. doi:S0006-3223(08)01531-X [pii]

10.1016/j.biopsych.2008.12.003

Cho SC, Kim JW, Kim BN, Hwang JW, Park M, Kim SA, Cho DY, Yoo HJ, Chung US, Son JW, Park TW (2008) Possible association of the alpha-2A-adrenergic receptor gene with response time variability in attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B (6):957-963. doi:10.1002/ajmg.b.30725

Colhoun HM, McKeigue PM, Davey Smith G (2003) Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet* 361 (9360):865-872. doi:S0140673603127158 [pii]

Contini V, Victor MM, Cerqueira CC, Polina ER, Grevet EH, Salgado CA, Karam RG, Vitola ES, Belmonte-de-Abreu P, Bau CH (2011) Adrenergic alpha2A receptor gene is not associated with methylphenidate response in adults with ADHD. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 261 (3):205-211. doi:10.1007/s00406-010-0172-4

Curatolo P, Paloscia C, D'Agati E, Moavero R, Pasini A (2009) The neurobiology of attention deficit/hyperactivity disorder. *Eur J Paediatr Neurol* 13 (4):299-304. doi:S1090-3798(08)00112-8 [pii]

10.1016/j.ejpn.2008.06.003

da Silva TL, Pianca TG, Roman T, Hutz MH, Faraone SV, Schmitz M, Rohde LA (2008) Adrenergic alpha2A receptor gene and response to methylphenidate in attention-deficit/hyperactivity disorder-predominantly inattentive type. *J Neural Transm* 115 (2):341-345. doi:10.1007/s00702-007-0835-0

Deupree JD, Smith SD, Kratochvil CJ, Bohac D, Ellis CR, Polaha J, Bylund DB (2006) Possible involvement of alpha-2A adrenergic receptors in attention deficit hyperactivity disorder: radioligand binding and polymorphism studies. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141B (8):877-884. doi:10.1002/ajmg.b.30371

Eley TC, Rijdsdijk F (2005) Introductory guide to the statistics of molecular genetics. *J Child Psychol Psychiatry* 46 (10):1042-1044. doi:JCPP1523 [pii]

10.1111/j.1469-7610.2005.01523.x

Faraone SV, Mick E (2010) Molecular genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr Clin North Am* 33 (1):159-180. doi:S0193-953X(09)00106-3 [pii]

10.1016/j.psc.2009.12.004

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 (11):1313-1323. doi:S0006-3223(04)01226-0 [pii]

10.1016/j.biopsych.2004.11.024

Franke B, Neale BM, Faraone SV (2009) Genome-wide association studies in ADHD. *Hum Genet* 126 (1):13-50. doi:10.1007/s00439-009-0663-4

Froehlich TE, Epstein JN, Nick TG, Melguizo Castro MS, Stein MA, Brinkman WB, Graham AJ, Langberg JM, Kahn RS (2011) Pharmacogenetic predictors of methylphenidate dose-response in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 50 (11):1129-1139 e1122. doi:10.1016/j.jaac.2011.08.002

S0890-8567(11)00689-7 [pii]

- Genro JP, Roman T, Rohde LA, Hutz MH (2012) The Brazilian contribution to Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder molecular genetics in children and adolescents. *Genetics and Molecular Biology* 35 (4 (suppl)):932-938
- Gibbons RD, Hedeker D, Elkin I, Waternaux C, Kraemer HC, Greenhouse JB, Shea MT, Imber SD, Sotsky SM, Watkins JT (1993) Some conceptual and statistical issues in analysis of longitudinal psychiatric data. Application to the NIMH treatment of Depression Collaborative Research Program dataset. *Arch Gen Psychiatry* 50 (9):739-750
- Gizer IR, Ficks C, Waldman ID (2009) Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet* 126 (1):51-90. doi:10.1007/s00439-009-0694-x
- Gueorguieva R, Krystal JH (2004) Move over ANOVA: progress in analyzing repeated-measures data and its reflection in papers published in the Archives of General Psychiatry. *Arch Gen Psychiatry* 61 (3):310-317. doi:10.1001/archpsyc.61.3.310
61/3/310 [pii]
- Hoehe MR, Berrettini WH, Lentes KU (1988) Dra I identifies a two allele DNA polymorphism in the human alpha 2-adrenergic receptor gene (ADRAR), using a 5.5 kb probe (p ADRAR). *Nucleic Acids Res* 16 (18):9070
- Hong SB, Kim JW, Cho SC, Shin MS, Kim BN, Yoo HJ (2012) Dopaminergic and noradrenergic gene polymorphisms and response to methylphenidate in Korean children with attention-deficit/hyperactivity disorder: is there an interaction? *J Child Adolesc Psychopharmacol* 22 (5):343-352. doi:10.1089/cap.2011.0076
- Ioannidis JP, Trikalinos TA, Ntzani EE, Contopoulos-Ioannidis DG (2003) Genetic associations in large versus small studies: an empirical assessment. *Lancet* 361 (9357):567-571. doi:S0140-6736(03)12516-0 [pii]
10.1016/S0140-6736(03)12516-0
- Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19 (19):5444
- Laird N, Horvath, S., Xu, X. (2000) Implementing a unified approach to family based tests of association. *Genet Epidemiol* 19:S36-S42.
- Lario S, Cals J, Cases A, Oriola J, Torras A, Rivera F (1997) MspI identifies a biallelic polymorphism in the promoter region of the alpha 2A-adrenergic receptor gene. *Clin Genet* 51 (2):129-130
- Long JC (1999) Multiple Locus Haplotype Analysis, version 3.0. Software and documentation distributed by the author. Department of Human Genetics, University of Michigan Medical School, 4909 Buhl Bldg., Ann Arbor, MI 4819-0618.
- Mallinckrodt CH, Clark WS, David SR (2001) Accounting for dropout bias using mixed-effects models. *J Biopharm Stat* 11 (1-2):9-21. doi:10.1081/BIP-100104194
- Moron JA, Brockington A, Wise RA, Rocha BA, Hope BT (2002) Dopamine uptake through the norepinephrine transporter in brain regions with low levels of the dopamine transporter: evidence from knock-out mouse lines. *J Neurosci* 22 (2):389-395. doi:22/2/389 [pii]
- Mu XJ, Lu ZJ, Kong Y, Lam HY, Gerstein MB (2011) Analysis of genomic variation in non-coding elements using population-scale sequencing data from the 1000 Genomes Project. *Nucleic Acids Res* 39 (16):7058-7076. doi:10.1093/nar/gkr342
gkr342 [pii]

- Orvaschel H (1985) Psychiatric interviews suitable for use in research with children and adolescents. *Psychopharmacol Bull* 21 (4):737-745
- Park L, Nigg JT, Waldman ID, Nummy KA, Huang-Pollock C, Rappley M, Friderici KH (2005) Association and linkage of alpha-2A adrenergic receptor gene polymorphisms with childhood ADHD. *Mol Psychiatry* 10 (6):572-580. doi:4001605 [pii]
- 10.1038/sj.mp.4001605
- 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 (6):942-948. doi:164/6/942 [pii]
- 10.1176/appi.ajp.164.6.942
- Polanczyk G, Zeni C, Genro JP, Guimaraes 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):218-224. doi:64/2/218 [pii]
- 10.1001/archpsyc.64.2.218
- Rohde LA (2002) ADHD in Brazil: the DSM-IV criteria in a culturally different population. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 41 (9):1131-1133
- 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. doi:4001743 [pii]
- 10.1038/sj.mp.4001743
- 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* 105 (5):471-478. doi:10.1002/ajmg.1408 [pii]
- Roman T, Schmitz M, Polanczyk GV, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH (2003) Is the alpha-2A adrenergic receptor gene (ADRA2A) associated with attention-deficit/hyperactivity disorder? *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 120B (1):116-120. doi:10.1002/ajmg.b.20018
- Sanchez-Mora C, Ribases M, Mulas F, Soutullo C, Sans A, Pamias M, Casas M, Ramos-Quiroga JA (2012) [Genetic bases of attention deficit hyperactivity disorder]. *Rev Neurol* 55 (10):609-618. doi:rn2012344 [pii]
- Schmitz M, Denardin D, Silva TL, Pianca T, Roman T, Hutz MH, Faraone SV, Rohde LA (2006) Association between alpha-2a-adrenergic receptor gene and ADHD inattentive type. *Biol Psychiatry* 60 (10):1028-1033. doi:S0006-3223(06)00438-0 [pii]
- 10.1016/j.biopsych.2006.02.035
- Shaffer D, Gould MS, Brasic J, Ambrosini P, Fisher P, Bird H, Aluwahlia S (1983) A children's global assessment scale (CGAS). *Arch Gen Psychiatry* 40 (11):1228-1231

- Small KM, Liggett SB (2001) Identification and functional characterization of alpha(2)-adrenoceptor polymorphisms. *Trends Pharmacol Sci* 22 (9):471-477. doi:S0165-6147(00)01758-2 [pii]
- Smith AK, Mick E, Faraone SV (2009) Advances in genetic studies of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Curr Psychiatry Rep* 11 (2):143-148
- Stergiakouli E, Thapar A (2010) Fitting the pieces together: current research on the genetic basis of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Neuropsychiatr Dis Treat* 6:551-560. doi:10.2147/NDT.S11322
- 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. *J Child Psychol Psychiatry* 46 (10):1081-1088. doi:JCPP1533 [pii]
- 10.1111/j.1469-7610.2005.01533.x
- 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 (2):168-179. doi:S0890-8567(09)60366-X [pii]
- 10.1097/00004583-200102000-00011
- Wallis D, Russell HF, Muenke M (2008) Review: Genetics of attention deficit/hyperactivity disorder. *J Pediatr Psychol* 33 (10):1085-1099. doi:jsn049 [pii]
- 10.1093/jpepsy/jsn049
- Wang B, Wang Y, Zhou R, Li J, Qian Q, Yang L, Guan L, Faraone SV (2006) Possible association of the alpha-2A adrenergic receptor gene (ADRA2A) with symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141B (2):130-134. doi:10.1002/ajmg.b.30258
- Wang M, Ramos BP, Paspalas CD, Shu Y, Simen A, Duque A, Vijayraghavan S, Brennan A, Dudley A, Nou E, Mazer JA, McCormick DA, Arnsten AF (2007) Alpha2A-adrenoceptors strengthen working memory networks by inhibiting cAMP-HCN channel signaling in prefrontal cortex. *Cell* 129 (2):397-410. doi:S0092-8674(07)00344-3 [pii]
- 10.1016/j.cell.2007.03.015
- Weschler DI (1991) Examiner's manual: Weschler intelligence scale for children. 3 edn. Psychological Corporation, New York
- Wilens TE (2008) Effects of methylphenidate on the catecholaminergic system in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychopharmacol* 28 (3 Suppl 2):S46-53. doi:10.1097/JCP.0b013e318173312f
- 00004714-200806002-00003 [pii]
- Xu C, Schachar R, Tannock R, Roberts W, Malone M, Kennedy JL, Barr CL (2001) Linkage study of the alpha2A adrenergic receptor in attention-deficit hyperactivity disorder families. *Am J Med Genet* 105 (2):159-162. doi:10.1002/1096-8628(2001)9999:9999<::AID-AJMG1160>3.0.CO;2-B [pii]

Table 1: Association analyses for *ADRA2A* polymorphisms by a family-based method^a.

Polymorphisms	Alleles	N ^b	Observed ^c	Expected ^d	Z	P value
Total Hospital Sample^e						
<i>MspI</i>	C	186	217	227	-1.250	0.211
	G		169	159	1.250	
<i>HhaI</i>	A	103	65	65	-0.089	0.928
	G		145	144	0.089	
<i>DraI</i>	C	141	186	198	-1.809	0.070
	T		108	96	1.809	
Combined Subtype^e						
<i>MspI</i>	C	118	133	139	-1.031	0.302
	G		107	100	1.031	
<i>HhaI</i>	A	68	45	45	-0.108	0.913
	G		95	94	0.108	
<i>DraI</i>	C	86	111	121	-1.961	0.049
	T		65	55	1.961	
Inattentive Subtype^f						
<i>MspI</i>	C	106	124	126	-0.421	0.673
	G		92	89	0.421	
<i>HhaI</i>	A	55	33	33	0.000	1.000
	G		77	77	0.000	
<i>DraI</i>	C	84	113	111	0.293	0.769
	T		59	60	-0.293	
ADHD + ODD/CD^e						
<i>MspI</i>	C	102	115	124	-1.543	0.122
	G		91	82	1.543	
<i>HhaI</i>	A	58	40	37	0.728	0.466
	G		76	79	-0.728	
<i>DraI</i>	C	83	107	116	-1.910	0.056
	T		61	51	1.910	

^aFBAT statistics;^bNumber of informative families included in the test;^cObserved number of transmissions;^dExpected number of transmissions;^eOnly families from hospital sample included;^fIndividuals from both hospital and community samples included.

Note: *MspI* was previously analyzed by a different family-based method in part of the hospital families (Roman et al. 2003) and in the whole community sample (Schmitz et al. 2006).

Table 2: Association analysis of *ADRA2A* haplotypes by a family-based method^a.

Haplotypes ^b	Frequencies	N ^c	Observed ^d	Expected ^e	Z	P value
Total Hospital Sample^f						
C/G/C	0.661	152	220	230	-1.247	0.212
G/G/T	0.186	122	102	90	1.783	0.074
G/A/C	0.125	86	69	67	0.365	0.715
Combined Subtype^f						
C/G/C	0.654	98	135	143	-1.168	0.242
G/G/T	0.182	76	62	52	1.929	0.053
G/A/C	0.131	59	50	49	-0.107	0.915
Innattentive Subtype^g						
C/G/C	0.616	87	124	124	-0.088	0.930
G/G/T	0.217	76	59	59	-0.000	0.999
G/A/C	0.137	49	34	32	0.367	0.713
ADHD + ODD/CD^f						
C/G/C	0.665	87	120	131	-1.744	0.081
G/G/T	0.173	72	55	46	1.855	0.063
G/A/C	0.130	49	41	39	0.748	0.454

^aFBAT statistics;^bHaplotype sequence: *MspI/HhaI/DraI*;^cNumber of informative families included in the test;^dObserved number of transmissions;^eExpected number of transmissions;^fOnly families from hospital sample included;^gIndividuals from both hospital and community samples included.

Table 3: Association analyses of *ADRA2A* polymorphisms and mean SNAP-IV scores^a in probands from hospital sample, performed by ANCOVA.

Genotypes	Inattention	Hyperactivity/ impulsivity	Opposition	Total
<i>MspI</i>				
C/C	1.83±0.56	1.62±0.76	1.25±0.76	1.58±0.56
C/G	2.01±0.52	1.61±0.78	1.14±0.76	1.60±0.54
G/G	2.01±0.60	1.78±0.74	1.22±0.81	1.68±0.54
<i>F</i>	3.649	0.248	0.523	0.236
<i>P</i>	0.027 ^b	0.780 ^b	0.593 ^c	0.790 ^b
<i>HhaI</i>				
A/A	1.98±0.60	1.69±0.93	1.28±0.90	1.67±0.74
A/G	1.98±0.57	1.65±0.77	1.16±0.74	1.61±0.53
G/G	1.94±0.55	1.63±0.77	1.20±0.78	1.60±0.55
<i>F</i>	0.294	0.028	0.164	0.046
<i>P</i>	0.744 ^f	0.972 ^f	0.849 ^f	0.955 ^f
<i>DraI</i>				
C/C	1.90±0.55	1.60±0.78	1.18±0.74	1.57±0.56
C/T	2.03±0.55	1.71±0.75	1.29±0.84	1.69±0.55
T/T	2.05±0.58	1.53±0.80	0.73±0.45	1.46±0.39
<i>F</i>	2.342	0.450	2.654	1.174
<i>P</i>	0.098 ^c	0.638 ^d	0.072 ^d	0.311 ^d

^aMean scores (± standard deviation);

Potential confounders considered in analyses (see methods): ^bAge and ADHD subtype; ^cAge and IQ; ^dAge and conduct disorder; ^eAge, mood disorder and ADHD subtype; ^fAge.

Note: *MspI* was previously analyzed in part of the sample (Roman et al. 2006).

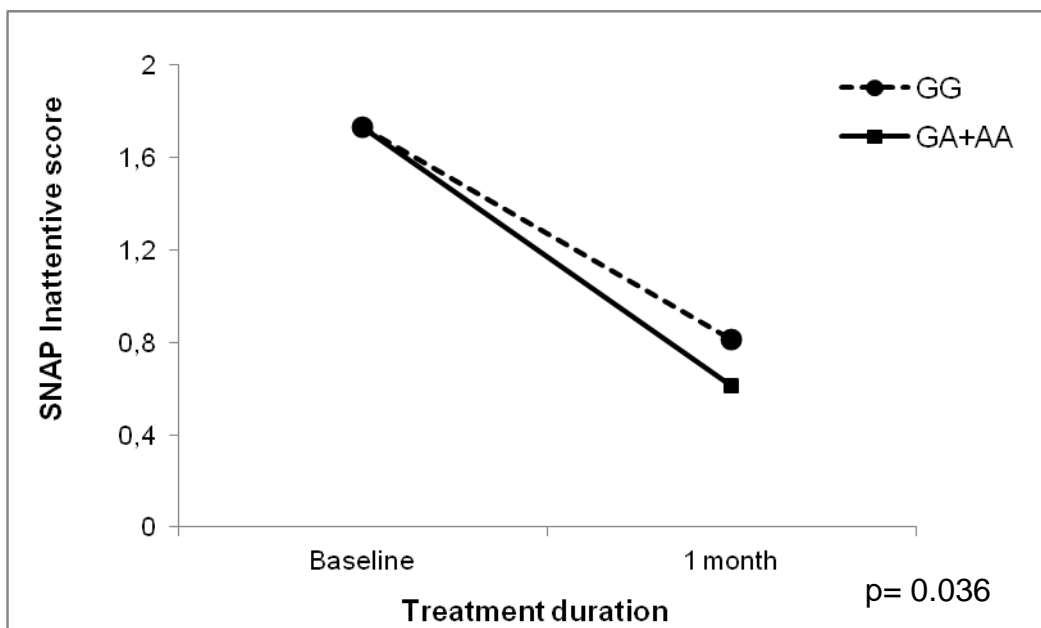


Figure 1: Mean SNAP-IV Inattentive scores during MPH treatment according to *HhaI* genotype in a mixed-effect model (MEM; n=59). Values of SNAP-IV baseline and after 1 month were 1.73 and 0.81, respectively, for GG genotype; while values of SNAP-IV baseline and after 1 month were 1.73 and 0.61, respectively, for the presence of A allele (GA+AA). The baseline values have the same starting point due to the adjustment made by SNAP-IV inattentive baseline score.

Estudos vêm sendo desenvolvidos a fim de elucidar as causas que podem estar influenciando a etiologia do TDAH. Diversas variantes genéticas de pequeno efeito atuam em conjunto neste transtorno, uma vez que é considerada uma doença complexa e multifatorial. Genes codificadores de componentes das vias catecolaminérgicas são os mais analisados. No entanto, os achados dos mais diferentes trabalhos que buscam fatores genéticos envolvidos na etiologia do TDAH ainda não são conclusivos, e investigações com genes candidatos têm demonstrado resultados controversos.

O gene *ADRA2A* analisado neste trabalho é um dos que apresenta tanto resultados positivos quanto negativos para os polimorfismos mais estudados, *MspI*, *HhaI* e *DraI*. Parte dos achados aqui encontrados corroboram aqueles previamente relatados pelo nosso grupo, em que o efeito do gene *ADRA2A* na nossa população, particularmente sobre os sintomas de desatenção, parece estar mesmo relacionado ao polimorfismo *MspI* (Roman *et al.*, 2003; Roman *et al.*, 2006; Schmitz *et al.*, 2006). Outros resultados sugerem que o SNP *DraI* também possa estar atuando na nossa amostra, tanto de forma independente como vinculada ao *MspI*, embora nossas análises não tenham tido poder suficiente para detectar efeitos significativos. Além disso, este foi o primeiro estudo a identificar uma associação do polimorfismo *HhaI* com a melhora dos sintomas de desatenção durante o tratamento com MPH em indivíduos com TDAH-D. No entanto, esse resultado pode ser um reflexo do achado anterior com o *MspI* para a mesma amostra (da Silva *et al.*, 2008); já que esses polimorfismos apresentam elevado DL, é possível que o *HhaI* atue apenas como um marcador, sem influência na etiologia do TDAH. Uma discussão detalhada sobre os nossos resultados foi desenvolvida no Capítulo III. Aqui, será dissertado sobre alguns pontos mencionados na seção anterior, porém com uma visão mais ampla do assunto, além de serem discutidos outros aspectos.

O TDAH afeta tanto crianças e adolescentes como pode continuar até a fase adulta. Esse transtorno atinge uma parcela significativa da sociedade e muitos são os impactos que a doença pode ter nesses indivíduos, como prejuízos na escola e na relação familiar e social. Muitas pesquisas vêm sendo realizadas com crianças e adolescentes, e em menor quantidade com adultos. Entretanto, uma questão limitante de estudos com crianças e adolescente afetadas por este transtorno é que, possivelmente, o TDAH persistente seja a forma mais “familiar” do transtorno (Faraone *et al.*, 2006). Logo amostras de crianças podem introduzir um ruído adicional por incluir um grande subgrupo de casos em que

ocorre remissão do TDAH, e onde a etiologia da doença pode ser sujeita a uma menor influência de fatores genéticos (Mick *et al.*, 2010; Sanchez-Mora *et al.*, 2012). Isso sugere que as amostras de crianças e adolescentes tendem a ser mais heterogêneas do que de adultos, mesmo quando as questões metodológicas, o tamanho amostral e as características dos pacientes são praticamente idênticas entre diferentes estudos, pois a questão da heterogeneidade é inerente ao transtorno. Atualmente, é impossível prever em quais pacientes a doença irá persistir. Contudo, essa questão ajuda a compreender um pouco os resultados controversos relacionados ao TDAH.

A diversidade de frequência dos alelos gerados pelos SNPs também pode ser um fator que esteja contribuindo para os achados confusos da literatura. Estudos já verificaram que a prevalência dos polimorfismos é alterada conforme a etnia da população (Belfer *et al.*, 2005; Small *et al.*, 2006). Com isso, os trabalhos investigando genes candidatos podem encontrar associação com alelos diferentes dependendo da etnia estudada. Em relação ao *ADRA2A*, para o polimorfismo *MspI*, por exemplo, Wang, B. *et al.* (2006) detectaram que a frequência do alelo G na população chinesa (0,66) foi quase igual à observada para o alelo C (0,71) em amostras com ascendência europeia. Os autores sugerem que esta diferença substancial possa indicar que o alelo G na população chinesa e o alelo C nas populações de origem europeia poderiam ter padrões de desequilíbrio de ligação equivalentes; assim, alelos diferentes estariam relacionados aos mesmos potenciais *locus* causadores de TDAH. Essa divergência na prevalência dos alelos diferindo de acordo com a população pode evidenciar que a correlação genótipo-fenótipo não é perfeita, ou seja, não é suficiente para explicar a suscetibilidade ao TDAH, podendo ser alterada pelo *background* genético.

A exceção para esta hipótese é o trabalho de Deupree *et al.* (2006), uma vez que analisa a possibilidade de associação com os alelos C, G e C do *MspI*, *HhaI* e *DraI*, respectivamente, em uma amostra de origem europeia ao invés dos alelos G, A e T, contrariando todos os outros estudos com amostras dessa etnia (Xu *et al.*, 2001; Roman *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2005; Stevenson *et al.*, 2005; Roman *et al.*, 2006; Schmitz *et al.*, 2006). Considerando o resultado do trabalho de Deupree *et al.* (2006) (associação com o alelo C), mais investigações devem ser realizadas para que se possa confirmar essa hipótese. Embora tenha sido sugerido que o *MspI* possa ter efeito funcional, seu impacto na expressão do *ADRA2A*, assim como dos demais SNPs, seja individualmente ou em um

bloco haplotípico, ainda não está claro (Belfer *et al.*, 2005; Small *et al.*, 2006). É também possível que SNPs ainda não descritos no gene venham a ser mais importantes funcionalmente do que a variação já conhecida atualmente.

Outra possibilidade a ser considerada é a de que o *locus* de suscetibilidade para o TDAH não seja o *ADRA2A* em si, mas outro em DL com este; então, a variação populacional deste outro *locus* refletir-se-ia nos achados do primeiro. Como exemplo, podemos citar o SNP *Taq1A* (rs1800497), que troca C>T (Grandy *et al.*, 1993). Acreditava-se, inicialmente, que esse polimorfismo estava localizado na região 3' do gene *DRD2*. Porém, posteriormente, verificou-se que ele está na verdade dentro do éxon 9 do gene *ankyrin repeat and kinase domain containing 1 (ANKK1)*, codificado pela sequência complementar ao *DRD2* no sentido reverso. A localização do *Taq1A* numa região codificante do *ANKK1* levou a questionar as razões pelas quais esse polimorfismo está associado ao *DRD2*, uma vez que fica a jusante do códon de terminação deste (Ponce *et al.*, 2009). Estudos indicam que os genes *DRD2* e *ANKK1* formam um *cluster* juntamente com outros dois genes, o qual é bastante conservado ao longo da evolução dos vertebrados. Embora ainda não se tenha clareza do efeito de cada um dos polimorfismos descritos sobre as funções biológicas relacionadas, pesquisadores sugerem que o *cluster* atue como um bloco funcional, o que vem sendo corroborado por evidências de interações gene-gene envolvendo estes *loci* (Yerushalmi & Teicher, 2007; Huang *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2012). Considerando-se que o *Taq1A* apresenta frequências variáveis entre as diferentes etnias e populações estudadas, é possível que a estrutura genômica ao redor do mesmo também varie nesses diferentes grupos, o que poderia explicar resultados controversos relatados para este gene. A hipótese de algo semelhante estar acontecendo com o gene *ADRA2A* não pode ser descartada.

Estudos de farmacogenética no TDAH vêm sendo cada vez mais realizados, assim como sugerida sua importância; no entanto, sua aplicabilidade ainda é discutível. Não seria viável, por exemplo, que crianças e adolescentes com TDAH fossem genotipadas para o SNP *HhaI* em vista de sua associação com a melhora nos sintomas de desatenção, verificada neste trabalho, mesmo se considerássemos que este efeito não fosse reflexo do *MspI*. A identificação desse SNP não seria suficiente para determinar o uso da medicação e nem o seu manejo, uma vez que o TDAH sofre influência de muitas variantes genéticas de pequeno efeito atuando em conjunto, como mencionado anteriormente. Entretanto, o

resultado aqui encontrado, aliado ao de outras investigações pode ser importante para melhor compreender a etiologia da doença.

Os achados de estudos de farmacogenética, por outro lado, podem ser úteis na prática clínica em relação a um aspecto específico, como por exemplo, algum efeito colateral em um determinado tipo de paciente. Isso foi verificado no estudo de Bruxel *et al.* (2012) que sugere a influência do polimorfismo -75T>G do gene da carboxilesterase 1 na redução do apetite, efeito adverso importante do tratamento de MPH em crianças com TDAH. Portadores do alelo G tiveram maior redução do apetite em relação aos homocigotos TT, com um valor de *odds ratio* considerável (3,47) para fenótipos multifatoriais. Isoladamente, esta informação poderia ser utilizada para um controle mais adequado desta consequência nos pacientes, uma vez que é queixa importante por parte dos pais, e pode ser motivo de não aderência, ou interrupção não planejada do tratamento. Somados a outros genes e outros fatores, os resultados individuais poderiam contribuir para um algoritmo de predição que norteasse o tratamento, como exemplificado no trabalho de Botton *et al.* (2011), que investigou a variabilidade da resposta a fármacos antitrombóticos. A implicação desse estudo foi o desenvolvimento de um modelo algoritmo que inclui fatores genéticos, biológicos e farmacológicos e que explica 63,3% da variação de dose do fármaco varfarina, podendo ser utilizado na prática.

Acreditamos que estamos longe ainda de se obter, através da farmacogenética uma resposta terapêutica individualmente adequada no TDAH, de maneira a reduzir os efeitos adversos e aumentar a eficácia da resposta aos medicamentos. Ainda há muito para ser esclarecido, por isso há a necessidade de estudos básicos que contribuirão para o conhecimento de forma geral, para então colocá-lo em prática. Contudo, as informações genéticas com certeza ajudarão a esclarecer a patofisiologia do transtorno e a produzir conhecimento que poderá auxiliar o profissional a melhorar a vida dos pacientes.

A maioria dos estudos moleculares realizados com o TDAH estão levando em consideração a presença de determinado genótipo em indivíduos para a detecção da associação com a doença. Todavia, surgem cada vez mais trabalhos que estudam a influência de outros mecanismos que podem alterar a expressão gênica, como mudanças epigenéticas e fatores de transcrição. Efeitos epigenéticos são hereditários, no entanto, ocorrem devido a mudanças moleculares reversíveis que não são atribuídas a variações da sequência de DNA. O ambiente é um modificador genético potente, que influencia a

expressão do gene através desses mecanismos epigenéticos. A desregulação epigenética está implicada na patogênese de uma variedade de doenças relacionadas com o cérebro, incluindo transtornos psiquiátricos complexos (Shumay *et al.*, 2010; Stergiakouli & Thapar, 2010). Em concordância com isso, alguns trabalhos têm investigado, além das características genéticas, os mecanismos de regulação e expressão gênica. Por exemplo, estudos de associação com o gene *DAT1*, muito pesquisado no TDAH e em outras doenças psiquiátricas, têm mostrado resultados inconsistentes. Por causa desses achados, as características genômicas deste *locus* e seu potencial estado epigenético foram minuciosamente investigados no trabalho de Shumay *et al.* (2010). Os resultados desse estudo evidenciaram uma elevada variabilidade interindividual nas sequências do gene *DAT1* e uma sensibilidade marcante na regulação por mecanismos epigenéticos, sugerida por uma composição rica em nucleotídeos GC e numerosas ilhas CpG intragênicas. A partir deste, investigações com hipóteses inéditas despontaram. Um deles está sendo realizado no nosso Programa de Pós Graduação pelo aluno de doutorado Lucas Araújo de Azeredo. Seu trabalho tem o objetivo de analisar as inter-relações entre o gene *DAT1*, dois genes que codificam fatores de transcrição reguladores do mesmo, o tabagismo e o TDAH em um contexto de interação gene-gene. Abordagens deste tipo, baseadas em diferentes mecanismos genéticos e com análise estatística refinada, podem ser importantes para o desenvolvimento e aprimoramento de modelos etiológicos para a doença.

É importante destacar ainda a necessidade de que mais estudos funcionais sejam desenvolvidos com os diferentes polimorfismos candidatos, a fim de auxiliar a esclarecer a etiologia do TDAH. Investigações funcionais *in vivo* em humanos têm obviamente restrições éticas, uma vez que estamos lidando com um transtorno que afeta os sistemas de neurotransmissão da região cerebral. Já nos estudos *in vitro* a metodologia empregada para avaliar as relações entre a expressão gênica e variantes de DNA apresentam inúmeras dificuldades e limitações, o que torna o trabalho bastante susceptível a falhas. Por outro lado, a bioinformática parece ser um ramo muito promissor. Há um crescente número de dados e ferramentas desenvolvidas que, com certeza, irão contribuir para os estudos funcionais de diversas variantes genéticas. Em relação ao *ADRA2A*, nosso grupo tem como perspectiva o desenvolvimento de uma linha de pesquisa que investigue a funcionalidade dos diferentes polimorfismos *in vitro* e *in silico*. A continuidade dos estudos deverá aumentar a nossa compreensão acerca da influência não só dos SNPs, mas também das

diferentes regiões gênicas na neurotransmissão noradrenérgica e, conseqüentemente, no TDAH. 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, melhorando o entendimento da contribuição do gene *ADRA2A* na etiologia da doença, especialmente em nossa população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS, G. D. & LAVIN, A. (2006). Methylphenidate increases cortical excitability via activation of alpha-2 noradrenergic receptors. **Neuropsychopharmacology** 31(3): 594-601.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (1994). **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. 4. ed. (DSM-IV). Washington D. C: American Psychiatric Association,
- ARNSTEN, A. F. (2000). Through the looking glass: differential noradrenergic modulation of prefrontal cortical function. **Neural Plast** 7(1-2): 133-146.
- ARNSTEN, A. F. & LI, B. M. (2005). Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. **Biol Psychiatry** 57(11): 1377-1384.
- ARNSTEN, A. F. & PLISZKA, S. R. (2011). Catecholamine influences on prefrontal cortical function: relevance to treatment of attention deficit/hyperactivity disorder and related disorders. **Pharmacol Biochem Behav** 99(2): 211-216.
- BANASCHEWSKI, T., BECKER, K., SCHERAG, S., FRANKE, B. & COGHILL, D. (2010). Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: an overview. **Eur Child Adolesc Psychiatry** 19(3): 237-257.
- BANERJEE, T. D., MIDDLETON, F. & FARAONE, S. V. (2007). Environmental risk factors for attention-deficit hyperactivity disorder. **Acta Paediatr** 96(9): 1269-1274.
- BELFER, I., BUZAS, B., HIPPI, H., PHILLIPS, G., TAUBMAN, J., *ET AL.* (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(1): 12-20.
- BERRIDGE, C. W., DEVILBISS, D. M., ANDRZEJEWSKI, M. E., ARNSTEN, A. F., KELLEY, A. E., *ET AL.* (2006). Methylphenidate preferentially increases catecholamine neurotransmission within the prefrontal cortex at low doses that enhance cognitive function. **Biol Psychiatry** 60(10): 1111-1120.
- 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(9481): 237-248.
- BIEDERMAN, J. & SPENCER, T. (1999). Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) as a noradrenergic disorder. **Biol Psychiatry** 46(9): 1234-1242.
- BOTTON, M. R., BANDINELLI, E., ROHDE, L. E., AMON, L. C. & HUTZ, M. H. (2011). Influence of genetic, biological and pharmacological factors on warfarin dose in a Southern Brazilian population of European ancestry. **Br J Clin Pharmacol** 72(3): 442-450.
- BRUXEL, E. M., SALATINO-OLIVEIRA, A., GENRO, J. P., ZENI, C. P., POLANCZYK, G. V., *ET AL.* (2012). Association of a carboxylesterase 1 polymorphism with appetite reduction in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder treated with methylphenidate. **Pharmacogenomics J**.
- CASTELLANOS, F. X., LEE, P. P., SHARP, W., JEFFRIES, N. O., GREENSTEIN, D. K., *ET AL.* (2002). Developmental trajectories of brain volume abnormalities in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. **JAMA** 288(14): 1740-1748.
- CHEON, K. A., CHO, D. Y., KOO, M. S., SONG, D. H. & NAMKOONG, K. (2009). Association between homozygosity of a G allele of the alpha-2a-adrenergic receptor gene and

- methylphenidate response in Korean children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biol Psychiatry** 65(7): 564-570.
- CHO, S. C., KIM, J. W., KIM, B. N., HWANG, J. W., PARK, M., *ET AL.* (2008). Possible association of the alpha-2A-adrenergic receptor gene with response time variability in attention deficit hyperactivity disorder. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet** 147B(6): 957-963.
- CONTINI, V., VICTOR, M. M., CERQUEIRA, C. C., POLINA, E. R., GREVET, E. H., *ET AL.* (2011). Adrenergic alpha2A receptor gene is not associated with methylphenidate response in adults with ADHD. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci** 261(3): 205-211.
- CURATOLO, P., PALOSCIA, C., D'AGATI, E., MOAVERO, R. & PASINI, A. (2009). The neurobiology of attention deficit/hyperactivity disorder. **Eur J Paediatr Neurol** 13(4): 299-304.
- DA SILVA, T. L., PIANCA, T. G., ROMAN, T., HUTZ, M. H., FARAONE, S. V., *ET AL.* (2008). Adrenergic alpha2A receptor gene and response to methylphenidate in attention-deficit/hyperactivity disorder-predominantly inattentive type. **J Neural Transm** 115(2): 341-345.
- DEUPREE, J. D., SMITH, S. D., KRATOCHVIL, C. J., BOHAC, D., ELLIS, C. R., *ET AL.* (2006). Possible involvement of alpha-2A adrenergic receptors in attention deficit hyperactivity disorder: radioligand binding and polymorphism studies. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet** 141B(8): 877-884.
- ELIA, J., GAI, X., XIE, H. M., PERIN, J. C., GEIGER, E., *ET AL.* (2010). Rare structural variants found in attention-deficit hyperactivity disorder are preferentially associated with neurodevelopmental genes. **Mol Psychiatry** 15(6): 637-646.
- FARAONE, S. V., 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, S. V. & MICK, E. (2010). Molecular genetics of attention deficit hyperactivity disorder. **Psychiatr Clin North Am** 33(1): 159-180.
- FARAONE, S. V., PERLIS, R. H., DOYLE, A. E., SMOLLER, J. W., GORALNICK, J. J., *ET AL.* (2005). Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biol Psychiatry** 57(11): 1313-1323.
- FENG, J., SOBELL, J. L., HESTON, L. L., GOLDMAN, D., COOK, E., JR., *ET AL.* (1998). Variants in the alpha2A AR adrenergic receptor gene in psychiatric patients. **Am J Med Genet** 81(5): 405-410.
- FRANKE, B., NEALE, B. M. & FARAONE, S. V. (2009). Genome-wide association studies in ADHD. **Hum Genet** 126(1): 13-50.
- FROEHLICH, T. E., EPSTEIN, J. N., NICK, T. G., MELGUIZO CASTRO, M. S., STEIN, M. A., *ET AL.* (2011). Pharmacogenetic predictors of methylphenidate dose-response in attention-deficit/hyperactivity disorder. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry** 50(11): 1129-1139 e1122.
- GENRO, J. P., KIELING, C., ROHDE, L. A. & HUTZ, M. H. (2010). Attention-deficit/hyperactivity disorder and the dopaminergic hypotheses. **Expert Rev Neurother** 10(4): 587-601.
- GENRO, J. P., ROMAN, T., ROHDE, L. A. & HUTZ, M. H. (2012). The Brazilian contribution to Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder molecular genetics in children and adolescents. **Genetics and Molecular Biology** 35(4 (suppl)): 932-938.

- GIZER, I. R., FICKS, C. & WALDMAN, I. D. (2009). Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. **Hum Genet** 126(1): 51-90.
- GRANDY, D. K., ZHANG, Y. & CIVELLI, O. (1993). PCR detection of the TaqA RFLP at the DRD2 locus. **Hum Mol Genet** 2(12): 2197.
- GREVET, E. H., BAU, C. H., SALGADO, C. A., FISCHER, A. G., KALIL, K., *ET AL.* (2006). Lack of gender effects on subtype outcomes in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: support for the validity of subtypes. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci** 256(5): 311-319.
- HINNEY, A., SCHERAG, A., JARICK, I., ALBAYRAK, O., PUTTER, C., *ET AL.* (2011). Genome-wide association study in German patients with attention deficit/hyperactivity disorder. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet** 156B(8): 888-897.
- HOEHE, M. R., BERRETTINI, W. H. & LENTES, K. U. (1988). Dra I identifies a two allele DNA polymorphism in the human alpha 2-adrenergic receptor gene (ADRAR), using a 5.5 kb probe (p ADRAR). **Nucleic Acids Res** 16(18): 9070.
- HONG, S. B., KIM, J. W., CHO, S. C., SHIN, M. S., KIM, B. N., *ET AL.* (2012). Dopaminergic and noradrenergic gene polymorphisms and response to methylphenidate in Korean children with attention-deficit/hyperactivity disorder: is there an interaction? **J Child Adolesc Psychopharmacol** 22(5): 343-352.
- HUANG, W., PAYNE, T. J., MA, J. Z., BEUTEN, J., DUPONT, R. T., *ET AL.* (2009). Significant association of ANKK1 and detection of a functional polymorphism with nicotine dependence in an African-American sample. **Neuropsychopharmacology** 34(2): 319-330.
- JARICK, I., VOLCKMAR, A. L., PUTTER, C., PECHLIVANIS, S., NGUYEN, T. T., *ET AL.* (2012). Genome-wide analysis of rare copy number variations reveals PARK2 as a candidate gene for attention-deficit/hyperactivity disorder. **Mol Psychiatry**.
- KIELING, R. & ROHDE, L. A. (2011). ADHD in Children and Adults: Diagnosis and Prognosis. **Curr Top Behav Neurosci**.
- LANGLEY, K., MARTIN, J., AGHA, S. S., DAVIES, C., STERGIAKOULI, E., *ET AL.* (2011). Clinical and cognitive characteristics of children with attention-deficit hyperactivity disorder, with and without copy number variants. **Br J Psychiatry** 199(5): 398-403.
- LARIO, S., CALLS, J., CASES, A., ORIOLA, J., TORRAS, A., *ET AL.* (1997). MspI identifies a biallelic polymorphism in the promoter region of the alpha 2A-adrenergic receptor gene. **Clin Genet** 51(2): 129-130.
- LASKY-SU, J., NEALE, B. M., FRANKE, B., ANNEY, R. J., ZHOU, K., *ET AL.* (2008). Genome-wide association scan of quantitative traits for attention deficit hyperactivity disorder identifies novel associations and confirms candidate gene associations. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet** 147B(8): 1345-1354.
- LINNET, K. M., DALSGAARD, S., OBEL, C., WISBORG, K., HENRIKSEN, T. B., *ET AL.* (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.
- LIONEL, A. C., CROSBIE, J., BARBOSA, N., GOODALE, T., THIRUVAHINDRAPURAM, B., *ET AL.* (2011). Rare copy number variation discovery and cross-disorder comparisons identify risk genes for ADHD. **Sci Transl Med** 3(95): 95ra75.
- LU, R. B., LEE, J. F., HUANG, S. Y., LEE, S. Y., CHANG, Y. H., *ET AL.* (2012). Interaction between ALDH2*1*1 and DRD2/ANKK1 TaqI A1A1 genes may be associated

- with antisocial personality disorder not co-morbid with alcoholism. **Addict Biol** 17(5): 865-874.
- MADRAS, B. K., MILLER, G. M. & FISCHMAN, A. J. (2005). The dopamine transporter and attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biol Psychiatry** 57(11): 1397-1409.
- MAKRIS, N., BIEDERMAN, J., MONUTEAUX, M. C. & SEIDMAN, L. J. (2009). Towards conceptualizing a neural systems-based anatomy of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Dev Neurosci** 31(1-2): 36-49.
- MASELLIS, M., BASILE, V. S., MUGLIA, P., OZDEMIR, V., MACCIARDI, F. M., *ET AL.* (2002). Psychiatric pharmacogenetics: personalizing psychostimulant therapy in attention-deficit/hyperactivity disorder. **Behav Brain Res** 130(1-2): 85-90.
- MICK, E., NEALE, B., MIDDLETON, F. A., MCGOUGH, J. J. & FARAONE, S. V. (2008). Genome-wide association study of response to methylphenidate in 187 children with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet** 147B(8): 1412-1418.
- MICK, E., TODOROV, A., SMALLEY, S., HU, X., LOO, S., *ET AL.* (2010). Family-based genome-wide association scan of attention-deficit/hyperactivity disorder. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry** 49(9): 898-905 e893.
- MILLS, R. E., WALTER, K., STEWART, C., HANDSAKER, R. E., CHEN, K., *ET AL.* (2011). Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing. **Nature** 470(7332): 59-65.
- MORON, J. A., BROCKINGTON, A., WISE, R. A., ROCHA, B. A. & HOPE, B. T. (2002). Dopamine uptake through the norepinephrine transporter in brain regions with low levels of the dopamine transporter: evidence from knock-out mouse lines. **J Neurosci** 22(2): 389-395.
- NEALE, B. M., LASKY-SU, J., ANNEY, R., FRANKE, B., ZHOU, K., *ET AL.* (2008). Genome-wide association scan of attention deficit hyperactivity disorder. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet** 147B(8): 1337-1344.
- NEALE, B. M., MEDLAND, S., RIPKE, S., ANNEY, R. J., ASHERSON, P., *ET AL.* (2010a). Case-control genome-wide association study of attention-deficit/hyperactivity disorder. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry** 49(9): 906-920.
- NEALE, B. M., MEDLAND, S. E., RIPKE, S., ASHERSON, P., FRANKE, B., *ET AL.* (2010b). Meta-analysis of genome-wide association studies of attention-deficit/hyperactivity disorder. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry** 49(9): 884-897.
- NEWCORN, J. H. (2008). Co-morbidity in adults with ADHD. **CNS Spectr** 13(8 Suppl 12): 12-15.
- PARK, L., NIGG, J. T., WALDMAN, I. D., NUMMY, K. A., HUANG-POLLOCK, C., *ET AL.* (2005). Association and linkage of alpha-2A adrenergic receptor gene polymorphisms with childhood ADHD. **Mol Psychiatry** 10(6): 572-580.
- POLANCZYK, G., BIGARELLA, M. P., HUTZ, M. H. & ROHDE, L. A. (2010). Pharmacogenetic approach for a better drug treatment in children. **Curr Pharm Des** 16(22): 2462-2473.
- 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(6): 942-948.
- POLANCZYK, G., ZENI, C., GENRO, J. P., GUIMARAES, A. P., ROMAN, T., *ET AL.* (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): 218-224.

- PONCE, G., PEREZ-GONZALEZ, R., ARAGUES, M., PALOMO, T., RODRIGUEZ-JIMENEZ, R., *ET AL.* (2009). The ANKK1 kinase gene and psychiatric disorders. **Neurotox Res** 16(1): 50-59.
- POPTSOVA, M., BANERJEE, S., GOKCUMEN, O., RUBIN, M. A. & DEMICHELIS, F. (2013). Impact of constitutional copy number variants on biological pathway evolution. **BMC Evol Biol** 13(1): 19.
- ROHDE, L. A., BIEDERMAN, J., BUSNELLO, E. A., ZIMMERMANN, H., SCHMITZ, M., *ET AL.* (1999). ADHD in a school sample of Brazilian adolescents: a study of prevalence, comorbid conditions, and impairments. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry** 38(6): 716-722.
- ROMAN, T., POLANCZYK, G. V., ZENI, C., GENRO, J. P., ROHDE, L. A., *ET AL.* (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., SCHMITZ, M., POLANCZYK, G. V., EIZIRIK, M., ROHDE, L. A., *ET AL.* (2003). Is the alpha-2A adrenergic receptor gene (ADRA2A) associated with attention-deficit/hyperactivity disorder? **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet** 120B(1): 116-120.
- SANCHEZ-MORA, C., RIBASES, M., MULAS, F., SOUTULLO, C., SANS, A., *ET AL.* (2012). [Genetic bases of attention deficit hyperactivity disorder]. **Rev Neurol** 55(10): 609-618.
- SANDERS, S. J., MURTHA, M. T., GUPTA, A. R., MURDOCH, J. D., RAUBESON, M. J., *ET AL.* (2012). De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. **Nature** 485(7397): 237-241.
- SCHMITZ, M., DENARDIN, D., SILVA, T. L., PIANCA, T., ROMAN, T., *ET AL.* (2006). Association between alpha-2a-adrenergic receptor gene and ADHD inattentive type. **Biol Psychiatry** 60(10): 1028-1033.
- SHUMAY, E., FOWLER, J. S. & VOLKOW, N. D. (2010). Genomic features of the human dopamine transporter gene and its potential epigenetic States: implications for phenotypic diversity. **PLoS One** 5(6): e11067.
- SIMON, V., CZOBOR, P., BALINT, S., MESZAROS, A. & BITTER, I. (2009). Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis. **Br J Psychiatry** 194(3): 204-211.
- SMALL, K. M., BROWN, K. M., SEMAN, C. A., THEISS, C. T. & LIGGETT, S. B. (2006). Complex haplotypes derived from noncoding polymorphisms of the intronless alpha2A-adrenergic gene diversify receptor expression. **Proc Natl Acad Sci U S A** 103(14): 5472-5477.
- SMITH, A. K., MICK, E. & FARAONE, S. V. (2009). Advances in genetic studies of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Curr Psychiatry Rep** 11(2): 143-148.
- SONUGA-BARKE, E. J. (2005). Causal models of attention-deficit/hyperactivity disorder: from common simple deficits to multiple developmental pathways. **Biol Psychiatry** 57(11): 1231-1238.
- SPENCER, T. J., BIEDERMAN, J. & MICK, E. (2007). Attention-deficit/hyperactivity disorder: diagnosis, lifespan, comorbidities, and neurobiology. **J Pediatr Psychol** 32(6): 631-642.
- STERGIAKOULI, E. & THAPAR, A. (2010). Fitting the pieces together: current research on the genetic basis of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). **Neuropsychiatr Dis Treat** 6: 551-560.

- STEVENSON, J., LANGLEY, K., PAY, H., PAYTON, A., WORTHINGTON, J., *ET AL.* (2005). Attention deficit hyperactivity disorder with reading disabilities: preliminary genetic findings on the involvement of the ADRA2A gene. **J Child Psychol Psychiatry** 46(10): 1081-1088.
- TAN-KAM, T., SUTHISISANG, C., PAVASUTHIPAISIT, C., LIMSILA, P., PUANGPETCH, A., *ET AL.* (2013). Importance of pharmacogenetics in the treatment of children with attention deficit hyperactive disorder: a case report. **Pharmacogenomics and Personalized Medicine** 6(1): 3-7.
- THAPAR, A., RICE, F., HAY, D., BOIVIN, J., LANGLEY, K., *ET AL.* (2009). Prenatal smoking might not cause attention-deficit/hyperactivity disorder: evidence from a novel design. **Biol Psychiatry** 66(8): 722-727.
- TRIPP, G. & WICKENS, J. R. (2009). Neurobiology of ADHD. **Neuropharmacology** 57(7-8): 579-589.
- WALDMAN, I. D., NIGG, J. T., GIZER, I. R., PARK, L., RAPPLEY, M. D., *ET AL.* (2006). The adrenergic receptor alpha-2A gene (ADRA2A) and neuropsychological executive functions as putative endophenotypes for childhood ADHD. **Cogn Affect Behav Neurosci** 6(1): 18-30.
- WALLIS, D., RUSSELL, H. F. & MUENKE, M. (2008). Review: Genetics of attention deficit/hyperactivity disorder. **J Pediatr Psychol** 33(10): 1085-1099.
- WANG, B., WANG, Y., ZHOU, R., LI, J., QIAN, Q., *ET AL.* (2006). Possible association of the alpha-2A adrenergic receptor gene (ADRA2A) with symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet** 141B(2): 130-134.
- WANG, M., RAMOS, B. P., PASPALAS, C. D., SHU, Y., SIMEN, A., *ET AL.* (2007). Alpha2A-adrenoceptors strengthen working memory networks by inhibiting cAMP-HCN channel signaling in prefrontal cortex. **Cell** 129(2): 397-410.
- WILLIAMS, N. M., FRANKE, B., MICK, E., ANNEY, R. J., FREITAG, C. M., *ET AL.* (2012). Genome-wide analysis of copy number variants in attention deficit hyperactivity disorder: the role of rare variants and duplications at 15q13.3. **Am J Psychiatry** 169(2): 195-204.
- WILLIAMS, N. M., ZAHARIEVA, I., MARTIN, A., LANGLEY, K., MANTRIPRAGADA, K., *ET AL.* (2010). Rare chromosomal deletions and duplications in attention-deficit hyperactivity disorder: a genome-wide analysis. **Lancet** 376(9750): 1401-1408.
- XU, C., SCHACHAR, R., TANNOCK, R., ROBERTS, W., MALONE, M., *ET AL.* (2001). Linkage study of the alpha2A adrenergic receptor in attention-deficit hyperactivity disorder families. **Am J Med Genet** 105(2): 159-162.
- YERUSHALMI, U. & TEICHER, M. (2007). Examining emergence of functional gene clustering in a simulated evolution. **Bull Math Biol** 69(7): 2261-2280.

ANEXOS

ANEXO A – Termo de Consentimento Pós-Informação

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

ESTUDO DO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE – SUSCETIBILIDADE GENÉTICA E IDENTIFICAÇÃO DE GENES CANDIDATOS

Antes de sua participação neste estudo, é preciso esclarecer alguns detalhes importantes, para que possíveis dúvidas sejam resolvidas. Em caso de qualquer outra dúvida quanto à pesquisa ou sobre os seus direitos, vocês poderão contatar Tatiana Roman, bióloga e Mestre em Genética e Biologia Molecular, responsável pelo estudo, pelos telefones (051) 316-6735 ou (051) 311-2406.

Qual o objetivo desta pesquisa?

O objetivo do nosso estudo é conhecer um pouco mais sobre algumas das causas do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH). Pretendemos esclarecer a possível contribuição genética no TDAH. Para este fim, as crianças e os pais vão ser avaliados através de uma análise de DNA.

Como é feita esta análise do DNA?

Será coletada de cada indivíduo uma amostra de 5ml de sangue, através de punção venosa, usando-se agulhas e seringas descartáveis. Esta coleta será feita por um indivíduo treinado. De cada amostra de sangue será extraído o DNA, em laboratório. Com o DNA

teremos acesso à informação genética que pode estar relacionada com a doença, conforme explicado no item anterior. As amostras são identificadas por números, diferentes daqueles utilizados pelo Hospital. A quantidade de sangue coletada será suficiente para se extrair o DNA necessário ao estudo, que será completamente utilizado durante o mesmo. Após a investigação, o DNA não ficará armazenado, sendo desprezadas possíveis sobras deste material.

Quais os riscos em participar?

Poderá haver a formação de um pequeno hematoma local em função da coleta de sangue. Além deste, não há qualquer outro risco, nem para o paciente, nem para os pais, em participar deste projeto.

O que a família ganha com este estudo?

Este estudo poderá trazer vários benefícios, mesmo que a longo prazo. Com a análise do DNA, poderemos saber se diferentes genes atuam como fatores causadores da doença, e se estes genes atuam diferentemente em cada caso, como estamos supondo. Tendo-se observado isto, poderemos determinar com mais precisão que mecanismos biológicos estão envolvidos, e quais os medicamentos mais adequados, o que facilitará a escolha do tratamento, e o tornará mais eficiente. Além disso, havendo determinantes genéticos, estes poderão ser observados precocemente, o que contribuirá para estratégias de prevenção. Por fim, a sua participação ajudará no desenvolvimento de novos conhecimentos, que poderão eventualmente beneficiar vocês e outras pessoas que enfrentam o mesmo problema.

Quais são os seus direitos?

Os seus registros médicos serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados deste estudo poderão ser usados para fins científicos, mas vocês não serão identificados por nomes.

Sua participação no estudo é voluntária, de forma que, caso vocês decidam não participar, isto não afetará o tratamento normal a que a criança tem direito.

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PACIENTES

ACORDO EM PARTICIPAR DE UM ESTUDO EM GENÉTICA

Número do Estudo: _____ Cód. de Ident. do Indivíduo:

Nome do Indivíduo: _____

Data de Nascimento: ___/___/___

Nome do Pai: _____

Nome da Mãe: _____

Médico Supervisor: _____

Assinatura do paciente:

Assinatura do Pai:

Assinatura da Mãe:

Assinatura do Médico Supervisor:

Data: ___/___/___

ANEXO B – Resoluções do Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA



GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

RESOLUÇÃO

As Comissões Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela CONEP como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, reanalisaram o projeto:

Número: 98201

Título: "ESTUDO DO TRANSTORNO DE DEFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE – SUSCETIBILIDADE GENÉTICA E IDENTIFICAÇÃO DE GENES CANDIDATOS."

Autores: Luis Augusto Rohde, Mara Helena Hutz e Tatiana Roman.

- O mesmo foi aprovado, por estar adequado ética e metodologicamente, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Informado, de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde) e às Resoluções Normativas do GPPG/HCPA. Os autores deverão encaminhar relatórios semestrais sobre o andamento do Projeto.

Porto Alegre, 16 de setembro de 1998.


Profª Themis Reyerbel da Silveira,
Coordenadora do GPPG e CEP/HCPA.



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

RESOLUÇÃO

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

Projeto: 01-162

Pesquisadores:

LUIS AUGUSTO PAIM RCHDE

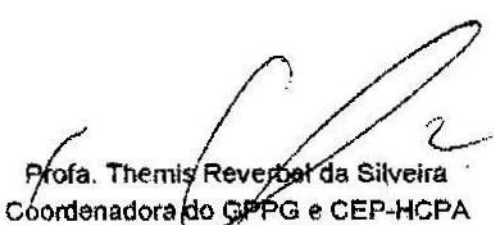
MARCELO SCHMITZ

Título: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE FATORES AMBIENTAIS NA ETIOLOGIA DO TRANSTORNO DE DEFICIT DE ATENÇÃO/HIPERATIVIDADE: COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS COM E SEM GENES CANDIDATOS E MEDIDA DA RESPOSTA A TRATAMENTO COM METILFENIDATO

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Este projeto por pertencer a uma área temática especial somente poderá ser iniciado após a sua aprovação pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Porto Alegre, 17 de Julho de 2001.


 Prof. Themis Reverte da Silveira
 Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

RESOLUÇÃO

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB000092) analisaram o projeto:

Projeto: 98-201

LUIS AUGUSTO PAIM ROHDE

Título: ESTUDO DO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HI-PERARITIVIDADE - SUSCETIBILIDADE GENÉTICA E IDENTIFICACAO DE GENES CANDIDATOS

Data da Versão:

EMENDA 1

16/01/2003

Este documento referente ao projeto acima foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, 02 de junho de


Profa. Themis Reyerbel da Silveira
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA

ANEXO C – Pareceres da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 060/2001

Processo nº 25000.040935/98-73 **Registro CONEP = 413** (Protocolo CEP 88201)
Projeto de Pesquisa: "Estudo do transtorno de déficit de atenção e hiperabilidade – suscetibilidade genética e identificação de genes candidatos".
Pesquisador Responsável: Dr. Luiz Augusto Rohde
Instituição: Hospital das Clínicas de Porto Alegre / HCPA
Área Temática Especial: Genética Humana


Ao se proceder à análise das respostas ao parecer CONEP nº 062/1999, relativo ao projeto em questão, considerou-se que:

- a) Foram atendidas as solicitações do referido parecer;
- b) O projeto atende aos requisitos fundamentais da Resolução CNS 196/96, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;
- c) O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação : Projeto aprovado.

Brasília, 24 de janeiro de 2001.


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP-MS

G P P G

Recebido em 05/02/2001

Por: 

FROM : MARCELO SCHMITZ

PHONE NO. : 51 3466577

Mar. 30 2005 12:28PM P2



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

A/C

TATIANA

ROMAN

TATIANA LAUFER DA SILVA
TLAUFER@IG.COM.BR
Lexapro
escritabran.03.ate

PARECER Nº 960/2001

Registro CONEP = 2718 (Este nº deverá ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Protocolo CEP = 01162

Processo nº 25000.076116/2001-30

Projeto de Pesquisa: "Avaliação da influência de fatores ambientais na etiologia do transtorno de déficit de atenção/hiperatividade : comparação entre grupos com e sem genes candidatos e medida da resposta a tratamento com metilfenidato".

Pesquisador Responsável: Dr. Luiz Augusto Rohde

Instituição: Hospital das Clínicas de Porto Alegre / HCPA

Área Temática Especial : Genética Humana

Ao se proceder à análise do protocolo em questão, cabem as seguintes considerações:

a) as informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais da Res. CNS 196/96, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;

b) o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - CEP da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta - se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação : Projeto aprovado.

Brasília, 23 de agosto de 2001.

William Saad Hossne
WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP-MS