

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO -1021 C/T NA  
REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA DOPAMINA BETA-HIDROXILASE E  
O TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE

JÚLIA PASQUALINI GENRO

Professor Orientador: Dra. Mara Helena Hutz

Co-orientador: Dra. Tatiana Roman

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

Porto Alegre, agosto de 2003.

## AGRADECIMENTOS

À Dra. Mara Hutz pela orientação, pela amizade e, principalmente, por ter me conduzido de maneira competente nos caminhos da ciência.

À Tati pela co-orientação, amizade, incentivo e pelos inestimáveis ensinamentos.

Aos queridos amigos Sil, Marilu e Everaldo por todo apoio, pela disposição e pela ajuda sempre bem humorada.

À todos colegas de laboratório, especialmente à Vê, Fabi e Erik por tornarem-se grandes amigos.

À minha mãe Leticia e a mana Bruna pela paciência, pelo carinho e pelo apoio incondicional.

Ao Luis, por todo amor, carinho e companheirismo.

Ào CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	1
1-INTRODUÇÃO .....	3
1.1-CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	3
1.2-BASE NEUROBIOLÓGICA .....	6
1.3-ETIOLOGIA .....	7
1.3.1-FATORES AMBIENTAIS.....	7
1.3.2-FATORES GENÉTICOS .....	8
1.4-GENES CANDIDATOS .....	10
1.5-DOPAMINA BETA-HIDROXILASE (DBH).....	11
2-JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS.....	14
3-MATERIAIS E MÉTODOS .....	15
3.1-AMOSTRAS.....	15
3.2-MÉTODOS LABORATORIAIS .....	15
3.2.1-EXTRAÇÃO DO DNA .....	15
3.2.2-AMPLIFICAÇÃO .....	16
3.2.3-ELETROFORESE .....	16
3.2.4-CLIVAGEM.....	16
3.2.5-ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	17
4-RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	18
5-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

## RESUMO

O Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), é um das doenças psiquiátricas mais comum na infância e na adolescência, afetando de 3 a 6% de crianças em idade escolar. É um transtorno de desenvolvimento, cujos sintomas nucleares são desatenção, hiperatividade e impulsividade. Estudos etiológicos do TDAH confirmam além de um componente ambiental, uma relevante contribuição genética. Vários genes já foram identificados como candidatos, principalmente do sistema catecolaminérgico, sugerindo uma suscetibilidade para o seu desenvolvimento. A enzima dopamina beta-hidroxilase (DBH), que converte dopamina em noradrenalina, está provavelmente implicada na fisiopatologia da doença. Estudos prévios do nosso grupo já demonstraram a associação de um polimorfismo do íntron 5 do gene da DBH com o TDAH. Outro polimorfismo na região promotora (C-1021T) foi associado com os níveis séricos desta enzima, sugerindo que ele funciona com um QTL. O objetivo deste estudo foi verificar se este polimorfismo da região promotora também está associado ao transtorno, podendo estar em desequilíbrio de ligação com a região intrônica. A amostra é composta por 134 indivíduos controle doadores de sangue do Hemocentro do Rio Grande do Sul e por 97 famílias com pelo menos 1 filho afetado. Os pacientes foram avaliados pelo Serviço de Psiquiatria da Infância e Adolescência do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), cujos casos foram configurados após 3 etapas de investigação: entrevistas semiestruturadas, discussão dos diagnósticos derivados e avaliação clínica. O polimorfismo C-1021T foi investigado pela técnica de PCR seguida de clivagem com a endonuclease HhaI. Comparando-se homocigotos CC e portadores do alelo T verificou-se que a prevalência de portadores do alelo T foi aproximadamente 16% mais elevada nos pacientes do

que na amostra controle ( $P= 0,027$ ). Nos pacientes com TDAH o alelo foi 10% mais freqüente do que nos controles ( $p=0,023$ ), indicando que esta variante é possivelmente um alelo de risco para doença. Utilizando o método do risco relativo de haplótipos (HRR), verificou-se uma tendência a transmissão preferencial do alelo ( $p=0,06$ ). Os resultados sugerem que o gene DBH é importante na suscetibilidade ao TDAH e que o polimorfismo -1021 C/T parece promissor para futuras investigações.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é uma doença psiquiátrica bastante freqüente na infância e na adolescência. As características nucleares do TDAH são a desatenção, a hiperatividade e a impulsividade, havendo prejuízo significativo do desempenho acadêmico, das relações familiares e do ajustamento social. Esta patologia afeta de 3% a 6% das crianças em idade escolar, sendo aproximadamente 4 vezes mais comum em meninos do que meninas (SMALLEY, 1997, BIEDERMAN, 1998; ROHDE e cols.,1999). É importante salientar que a prevalência pode se mostrar mais ampla na literatura, pois depende de vários aspectos, tais como os critérios diagnósticos utilizados, a idade e o sexo da população em estudo.

A quarta edição do Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais (DSM-IV; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION) classifica os sintomas do TDAH em dois grupos: desatenção e hiperatividade-impulsividade (Tabela 1). De acordo com esses critérios são necessários para caracterizar o TDAH, seis ou mais sintomas em pelo menos um dos grupos, por no mínimo 6 meses, com caracterização de prejuízo em função destes sintomas em mais de um ambiente (por exemplo: casa e escola) e início do prejuízo antes dos sete anos. Com base nesses sintomas, três tipos clínicos de TDAH podem ser reconhecidos. Quando o paciente apresentar seis ou mais sintomas do primeiro grupo, ele é classificado como predominantemente desatento; do segundo grupo, como predominantemente hiperativo-impulsivo e, se apresentar pelo menos seis sintomas em cada um dos grupos, o indivíduo

será do tipo combinado. A prevalência de cada tipo na população é bastante variável (FARAONE e cols.,1998). Em amostras provenientes de hospitais o tipo combinado é o mais comum, seguido pelo tipo desatento e por último, pelo tipo hiperativo-impulsivo.

Tabela 1: Sintomas do TDAH de acordo com o DSM-IV (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1994)

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

O curso clínico desta patologia é bastante heterogêneo. Embora possa ocorrer remissão espontânea com a idade, os sintomas podem persistir na adolescência e inclusive na vida adulta. Estudos demonstraram que sintomas de hiperatividade e impulsividade tendem a diminuir mais precocemente, enquanto os de desatenção, desorganização e distração são mais duradouros (SWANSON e cols. 1998). Os estudos longitudinais de Wender (2001) estimaram que 60 a 70% das crianças que apresentavam TDAH continuavam com esse diagnóstico na vida adulta.

O TDAH, como as demais doenças psiquiátricas, apresenta uma alta prevalência de comorbidades. Nas crianças afetadas por esta patologia, as comorbidades mais freqüentemente diagnosticadas são os transtornos de oposição-desafio e de conduta, mas transtornos de ansiedade, de humor e do aprendizado são também bastante comuns (BIEDERMAN, 1998).

O tratamento para o TDAH envolve basicamente dois tipos de intervenções: as psicossociais, onde os pais e a escola têm papel primário e as farmacoterápicas, onde a intervenção medicamentosa é aplicada. Os fármacos mais utilizados são os estimulantes; efetivos em cerca de 70% dos casos, e os antidepressivos tricíclicos, que são empregados quando a resposta aos estimulantes não é a esperada. Entre os estimulantes a droga mais utilizada é o metilfenidato e entre os tricíclicos, a imipramina (BIEDERMAN, 1998). Apesar da eficácia reconhecida, os efeitos específicos destes compostos no cérebro ainda não foram bem esclarecidos. A dopamina parece ser o principal alvo dos estimulantes, embora eles também pareçam atuar sobre o sistema noradrenérgico, enquanto os tricíclicos agem sobre diferentes sistemas, especialmente o noradrenérgico.

## 1.2 BASE NEUROBIOLÓGICA

Diferentes teorias foram propostas para explicar a patofisiologia do TDAH. A primeira a ser sugerida foi de uma disfunção fronto-límbica, onde um fraco controle inibitório da região cortical frontal sobre as funções límbicas originaria os sintomas deste transtorno (SATTERFIELD e DAWSON, 1971). Dados de estudos neuropsicológicos mostraram que crianças com TDAH têm uma performance prejudicada em funções cognitivas e executivas, como a atenção, percepção, planejamento e organização, além de falhas na inibição comportamental, processos claramente relacionados ao lobo frontal e áreas subcorticais (SWANSON e cols.,1998b; TANNOCK, 1998). O envolvimento de circuitos fronto-subcorticais na patofisiologia do TDAH foi sugerido, ainda, pelos estudos de neuroimagem (revisão em TANNOCK, 1998). De acordo com estas investigações, o lobo frontal (córtex frontal e pré-frontal), e os núcleos da base, especificamente o *striatum* (caudado) e globo pálido, parecem ter volume e atividade diminuídos em pacientes com esta patologia.

As primeiras teorias bioquímicas propostas para explicar o TDAH foram baseadas nas catecolaminas, visto que as regiões implicadas na sua patofisiologia são primariamente inervadas por estes neurotransmissores (FARAONE e BIEDERMAN, 1998; SWANSON e cols.,1998b). Evidências farmacológicas e de estudos com animais favoreceram inicialmente a teoria dopaminérgica do TDAH, onde um déficit de dopamina nas regiões corticais e do *striatum* seria responsável pela manifestação dos sintomas deste transtorno (LEVY, 1991). A idéia da hipofunção dopaminérgica surgiu em

função da ação do metilfenidato, uma vez que este medicamento aumenta a disponibilidade de dopamina na fenda sináptica, em regiões bem específicas como o *striatum* (VAIDYA e cols., 1998). Ainda que as teorias dopaminérgicas tenham prevalecido inicialmente, a contribuição de mecanismos noradrenérgicos parece, também, ter especial relevância na patofisiologia do TDAH. Os circuitos fronto-subcorticais possivelmente implicados no transtorno são ricos tanto em dopamina, como em noradrenalina (FARONE e BIEDERMAN, 1998). Algumas regiões encefálicas primariamente moduladas por redes noradrenérgicas, como o locus coeruleus e a região parietal superior direita, parecem estar envolvidas em processos de atenção seletiva (ARNSTEN e cols., 1996; PLISZKA e cols., 1996). Além disso, a eficácia clínica dos estimulantes provavelmente depende de alterações em funções dopaminérgicas e noradrenérgicas.

### 1.3 ETIOLOGIA

O estudo da etiologia do transtorno de déficit de atenção/hiperatividade vem sendo objeto de muitas pesquisas. Apesar do grande número de estudos já realizados, as causas do TDAH ainda não estão bem esclarecidas. Entretanto, a influência de fatores genéticos e ambientais no seu desenvolvimento é amplamente aceita na literatura (TANNOCK, 1998).

#### 1.3.1 FATORES AMBIENTAIS

Fatores psicossociais que atuam no funcionamento adaptativo e na saúde emocional da criança, tais como desentendimentos familiares e presença

de transtornos mentais nos pais, parecem ter papel importante no surgimento e na manutenção da doença. Algumas adversidades sociais, como discórdia marital severa, classe social baixa, família muito numerosa, criminalidade dos pais e colocação em lar adotivo, já foram associadas com o TDAH (BIEDERMAN e cols., 1995b). Complicações na gestação e no parto (FARAONE e BIEDERMAN, 1998), assim como o uso de álcool e nicotina pela mãe (MICK e cols., 2002), também parecem agir como fatores de risco para o desenvolvimento do transtorno. Outros fatores, como por exemplo, danos cerebrais perinatais no lobo frontal, podem estar relacionados indiretamente com a doença, já que afetam áreas implicadas nos processos de atenção, motivação e planejamento. Mecanismos estes, que são estreitamente relacionados com o TDAH (LEVY e cols., 1998).

### 1.3.2 FATORES GENÉTICOS

Os estudos genéticos clássicos sugerem uma importante contribuição de fatores genéticos na etiologia do TDAH. Estudos com famílias mostraram que este transtorno apresenta uma forte recorrência familiar. O risco para doença é de 2 a 8 vezes maior nos pais das crianças afetadas que na população em geral (FARAONE e BIEDERMAN, 1998; EPSTEIN e cols., 2000). Pesquisas com adotados mostraram que a prevalência da doença entre pais biológicos é cerca de 3 vezes maior do que entre pais adotivos de crianças com TDAH (THAPAR e cols., 1999). Os estudos com gêmeos demonstraram grande concordância para esta patologia, maior entre os monozigóticos do que entre os dizigóticos. A herdabilidade estimada é bastante alta, ultrapassando 70% na maioria das investigações (TANNOCK, 1998; THAPAR e cols., 1999).

Diferentes estudos já foram realizados para entender o padrão de herança da doença nas famílias. FARAONE e cols. (1992) e BIEDERMAN e cols. (1992) sugeriram a hipótese de um gene principal de efeito maior. Já MAHER e cols. (1999), analisando o TDAH em função do número de sintomas, sugeriram uma herança co-dominante. Embora não existam muitas evidências, o mais aceito é que a transmissão do TDAH ocorra através de vários genes de pequeno efeito, que interagem entre si e com o ambiente, conferindo suscetibilidade ao transtorno (NIGG e GOLDSMITH, 1998 e THAPAR e cols., 1999). É possível que diferentes genes estejam envolvidos em casos diversos da doença, e que o efeito de cada um deles mude de acordo com o contexto genético em que ele atua (STATE e cols., 2000).

A definição de tipos de TDAH pelo DSM-IV, assim como as diferentes formas de tratamento, e as várias doenças que podem coexistir com este transtorno mostram que, pelo menos ao nível fenotípico, o TDAH é uma patologia bastante heterogênea (SMALLEY e cols., 2000). É bem provável que esta heterogeneidade clínica se reflita numa heterogeneidade etiológica. Isto significa que fatores genéticos e ambientais diferentes devem atuar na manifestação das características que compõem os vários quadros clínicos do TDAH. Embora os estudos que relataram uma alta herdabilidade tenham considerado o TDAH como uma categoria diagnóstica única, é possível que esta definição não represente um fenótipo válido geneticamente e que existam aspectos ou subtipos etiológicos mais ou menos herdáveis dentro do TDAH (THAPAR e cols., 1999; TODD, 2000).

## 1.4 GENES CANDIDATOS

A identificação de genes candidatos no TDAH é relativamente recente. Desde o primeiro relato de associação de um marcador genético com o TDAH (COOK e cols., 1995), muitos estudos vêm tentando identificar possíveis genes de suscetibilidade para essa patologia. Evidências farmacológicas, bioquímicas e de estudos neurobiológicos indicaram o envolvimento dos sistemas dopaminérgico, noradrenérgico e mais recentemente serotoninérgico na patofisiologia dessa doença (PLISZKA e cols., 1996; CASTELLANOS, 1997; QUIST e KENNEDY, 2001). Portanto, genes relacionados a estes neurotransmissores parecem candidatos ideais para investigar a suscetibilidade genética ao TDAH.

O sistema dopaminérgico vem sendo o foco principal destes estudos. Um dos primeiros candidatos foi o gene do transportador de dopamina (DAT1), visto que o principal efeito dos estimulantes usados no tratamento do TDAH parece ser a inibição desta proteína, impedindo a recaptação da dopamina na fenda sináptica (SEEMAN e MADRAS, 1998). Como já mencionado, o primeiro estudo deste gene com o TDAH foi feito por COOK e cols. (1995). Estes autores investigaram um polimorfismo do tipo VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats) e detectaram através do método HRR (Risco Relativo de Haplótipos) uma associação do TDAH com o alelo de 480pb, correspondente a 10 cópias da unidade de repetição. Vários estudos repetiram esta investigação (WALDMAN e cols., 1998; CURRAN e cols.2001; ROMAN e cols., 2001; MAHER e cols., 2002), e a maioria deles conseguiu detectar um efeito do gene sobre a doença, ainda que bastante pequeno.

Outro gene do sistema dopaminérgico intensamente investigado é o gene do receptor D4 de dopamina (DRD4). O grande interesse por este gene surgiu a partir de sua associação com a dimensão de personalidade "busca de novidades", provavelmente relacionada ao TDAH. LaHoste e cols (1996) foram os primeiros a detectar a associação do alelo com 7 cópias da repetição de 48pb com o TDAH. Embora muitas investigações posteriores tenham replicado a associação com este gene, os resultados ainda são bastante controversos, parecendo depender significativamente da estratégia de análise utilizada (FARAONE e cols., 2001; MAHER e cols., 2002). Vários outros polimorfismos já foram estudados no gene DRD4, porém para a maioria deles, apenas um efeito conjunto com o VNTR de 48pb foi detectado. A possibilidade de interação entre os genes DRD4 e DAT1 foi investigada apenas por ROMAN e cols. (2001), que detectaram um efeito positivo sobre escores de hiperatividade/impulsividade.

Praticamente todos os demais genes conhecidos do sistema dopaminérgico já foram objeto de estudos de associação com TDAH, incluindo DRD2, DRD3 e DRD5. Porém as investigações com a maioria desses marcadores são ainda reduzidas, não permitindo conclusões definitivas (DiMAIO e cols., 2003).

## 1.5 DOPAMINA BETA-HIDROXILASE (DBH)

Considerando as evidências de estudos sobre a neurobiologia do TDAH, genes do sistema noradrenérgico também parecem ser ótimos candidatos para estudos moleculares. No entanto, um número reduzido de

estudos com estes genes foi realizado até o momento. Estas investigações concentraram-se, principalmente, no gene que codifica a enzima dopamina beta-hidroxilase, responsável por converter dopamina em noradrenalina. Este gene, o loco DBH, está ligado ao locus ABO, no cromossomo 9q34. Embora a dopamina beta-hidroxilase estabeleça uma ponte entre os sistemas dopaminérgico e noradrenérgicos, o DBH é considerado um gene do sistema noradrenérgico, uma vez que a enzima é encontrada em vesículas de neurônios noradrenérgicos e adrenérgicos.

A atividade enzimática da DBH no plasma é consideravelmente variável entre indivíduos, mas estável para o mesmo indivíduo ao longo do tempo. Grande parte desta variabilidade na atividade enzimática é determinada geneticamente. Níveis alterados dessa enzima foram relatados em vários distúrbios neurológicos e psiquiátricos. Considerando que o próprio gene codificador da enzima é o principal locus que controla sua atividade plasmática (ZABETIAN e cols., 2001), torna-se muito relevante a análise deste gene nos estudos moleculares com o TDAH.

O primeiro polimorfismo investigado foi um sítio de restrição *Taq I* localizado no íntron 5 do gene DBH (WU e cols., 1997). DALY e cols (1999) investigaram este polimorfismo em uma amostra de pacientes com TDAH. Estes autores verificaram a associação com um dos alelos (A2) tanto na amostra total, como em apenas pacientes do tipo combinado e em um subgrupo com história familiar da doença. COMINGS e cols (1999) também detectaram uma associação desse polimorfismo com o TDAH combinado e com deficiência de aprendizado. ROMAN e cols (2002) investigaram este mesmo polimorfismo, replicando os achados de DALY (1999). Neste estudo foi observada uma

transmissão preferencial do alelo A2 na amostra total e para o subgrupo de pacientes do tipo combinado, porém esta associação manteve-se em pacientes sem história familiar da doença, ao contrário da investigação de DALY e cols. (1999). Uma tendência à transmissão preferencial desse mesmo alelo foi verificada por WIGG e cols. (2002).

Analisando a estrutura do gene DBH, ZABETIAN e cols. (2001) identificaram um polimorfismo (-1021C/T) na região flanqueadora do gene, que esclarece de 35 a 52% da variabilidade na atividade plasmática da enzima. Mais recentemente estes mesmos autores (ZABETIAN e cols., 2003), estudando a estrutura do desequilíbrio de ligação no loco DBH, sugeriram uma forte influência na magnitude da associação entre marcadores dialélicos próximos ao sítio -1021 C/T e a atividade plasmática da enzima.

## 2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

Tendo em vista o forte componente genético do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, é de suma importância procurar identificar os genes de suscetibilidade envolvidos nesta patologia. Os estudos com genes candidatos realizados até hoje não foram suficientes para determinar os genes de suscetibilidade e qual a contribuição de cada um deles no TDAH. Além disso, a possibilidade de interação entre eles também não está bem elucidada. A identificação dos genes de suscetibilidade será fundamental para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e estratégias de prevenção.

O objetivo específico do presente trabalho foi verificar se o polimorfismo da região promotora -1021C/T do gene da DBH está associado ao TDAH. Além disso, se confirmada uma associação, possibilitar um estudo posterior para testar a existência de desequilíbrio de ligação entre este polimorfismo e o polimorfismo *Taq I* do íntron 5, visando identificar a variante funcional que confere suscetibilidade. Este polimorfismo já foi estudado por nosso grupo na mesma amostra, observando-se uma associação com o TDAH (ROMAN e cols., 2002).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 AMOSTRAS**

O grupo controle consiste de 134 homens caucasóides doadores de sangue do Hemocentro do Rio Grande do Sul. Já a amostra de pacientes constitui-se de 97 famílias com pelo menos um filho diagnosticado para o TDAH e seus pais biológicos. Os pacientes foram avaliados e diagnosticados pelo Serviço de Psiquiatria e Adolescência do Hospital de Clínica de Porto Alegre (HCPA), sendo os casos configurados após 3 etapas de investigação: a) aplicação de entrevista estruturada (Schedule for affective disorders and schizophrenia for school-age children, Epidemiologic version - K-SAD) (OVARSCHER, 1985) por entrevistador treinado. Esta entrevista estruturada deriva diagnósticos psiquiátricos conforme o DSM-IV, já traduzida para o português e em uso clínico em centros de referência nacionais de Psiquiatria da Infância e Adolescência; b) discussão dos diagnósticos derivados em comitê clínico, coordenado por psiquiatra da infância e adolescência com grande experiência clínica; c) avaliação clínica utilizando os critérios diagnósticos do DSM-IV.

#### **3.2 MÉTODOS LABORATORIAIS**

##### **3.2.1 EXTRAÇÃO DO DNA**

A extração de DNA foi realizada a partir de 5 ml de sangue total, baseada no método de "salting out" descrito por MILLER e cols. (1998).

### 3.2.2 AMPLIFICAÇÃO

O polimorfismo -1021 C/T do gene DBH foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os primers e as condições informadas pessoalmente por J. F. Cubbels; "forward" (GGA GGG ACA GCT TCT AGT CC) e "reverse" (CAC CTC TCC CTC CTG TCC TCT CGC). As condições de PCR foram 70-60°C; 30seg/30seg/30seg.

### 3.2.3 ELETROFORESE

Após cada PCR foi realizada uma eletroforese com o objetivo de verificar se a amplificação foi bem sucedida. Foi utilizado gel de agarose 1,5% com brometo de etídio, tendo as migrações durado cerca de 20 minutos a uma diferença de potencial de 100V. Sucedendo a migração, o gel foi observado sob luz ultravioleta e identificado um fragmento de 130 pb (pares de base) com auxílio de marcador de peso molecular de 25 pb.

### 3.2.4 CLIVAGEM

Os fragmentos amplificados de 130 pb foram submetidos ao processo de clivagem. Foram utilizadas 3 Unidades da enzima de restrição *HhaI* incubadas durante a noite a 37° C. Para separação dos fragmentos foi realizada eletroforese em gel de agarose a 3,5% contendo brometo de etídio. As migrações duraram cerca de 35 minutos a uma diferença de potencial de 80V. Sob luz ultravioleta foram observados fragmentos de três tamanhos diferentes, que foram determinados utilizando marcador de peso molecular de 25 pb, permitindo a identificação dos genótipos. Na presença do sítio de restrição (alelo C) a enzima clivava dando origem a dois fragmentos: um de 110 pb e outro de 20 pb. Na ausência do sítio (alelo T) a enzima não clivava, observando-se o fragmento de 130 pb.

### 3.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências alélicas foram estimadas por contagem direta e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado com base nessas frequências pelo teste do qui-quadrado. Para comparar as frequências genotípicas e alélicas entre os controles e os pacientes também foi utilizado o teste do qui-quadrado. Para análise dos dados das famílias foi utilizado o método estatístico do risco relativo de haplótipos (HRR) (TERWILLIGER e OTT, 1992). Neste método os alelos paternos e maternos são classificados como transmitidos ou não-transmitidos de acordo com o genótipo do filho afetado.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 4.1 são apresentadas as freqüências genóticas do polimorfismo -1021 C/T na amostra de pacientes, de seus pais e de indivíduos controles.

Tabela 4.1: Freqüências genóticas<sup>a</sup> do polimorfismo -1021 C/T do gene DBH de pacientes, seus pais e controles.

	Genótipos					
	CC		CT		TT	
	n	%	n	%	n	%
Pacientes (n= 79)	36	45,5	33	41,7	10	12,8
Pais (n= 139)	72	51,8	60	43,2	7	5,0
Controles (n=134)	82	61,2	41	30,6	11	8,2

a= apenas indivíduos caucasoídes foram incluídos nesta análise

Na amostra de pacientes observa-se que o genótipo homozigoto para o alelo C foi o mais frequente (45,5%). O alelo C está presente em 66% dos cromossomos da amostra de pacientes. Na amostra dos pais o genótipo CC correspondeu a 51,8% dos indivíduos estudados e o alelo C foi identificado em 73% da amostra dos pais. No grupo controle, o genótipo CC também foi o mais frequente (61,2%). O alelo C foi observado em 76,5% dos cromossomos dessa amostra.

Devido ao pequeno número de indivíduos TT, a análise de associação foi realizada reunindo-se os portadores do alelo T (genótipos CT e TT), conforme mostra a tabela 4.2. Comparando-se os homozigotos CC e portadores

do alelo T verificou-se que a prevalência de portadores do alelo T era aproximadamente 16% mais elevada nos pacientes do que na amostra controle ( $p=0,027$ ). Nos pacientes com TDAH o alelo T foi 10% mais freqüente do que nos controles ( $p= 0,023$ ), indicando que esta variante é possivelmente um alelo de risco para a doença.

Tabela 4.2: Frequências genóticas e alélicas do polimorfismo -1021 C/T do gene DBH em pacientes e controles.

	Genótipos				Alelos	
	CC		CT+ TT		C	T
	n	%	n	%	%	%
Pacientes (n=79)	36	45,5	43	54,5*	66,0	34,0**
Controles (n=134)	82	61,2	53	38,8	76,5	23,5

\*comparação de frequências de portadores e não portadores do alelo T em pacientes x controles:  $p= 0,027$

\*\* comparação de frequências alélicas em pacientes x controles:  $p= 0,023$

Outra abordagem utilizada foi o método do risco relativo de haplótipos (HRR; Tabela 4.3)

Tabela 4.3: Análise de associação do polimorfismo -1021 C/T do gene DBH através do HRR para amostra total<sup>a</sup>.

Alelos	T	C	Total
Transmitidos	49*	113	162
Não Transmitidos	34	128	162
Total	83	241	324

\* comparação de alelos transmitidos x não-transmitidos:  $p= 0,066$

<sup>a</sup>=89 pacientes de 73 trios (os dois genitores e o paciente) e 16 duplas (genitor e paciente)

Analisando a amostra total, observou-se uma tendência à transmissão preferencial do alelo T (ausência de sítio) no polimorfismo estudado do gene DBH ( $p=0,066$ ). Cabe ressaltar que o tamanho amostral variou entre os dois tipos de análises devido ao método utilizado. Na abordagem caso-contrôle o número de pacientes ficou em 79, pois foi necessário excluir nevróides e dentre as duplas de irmãos excluir 1 aleatoriamente. Já no método de famílias o número de pacientes ficou em 89, pois foi necessário excluir apenas as duplas (genitor-paciente) heterozigotas de genótipos iguais, que são não-informativas por não ser possível identificar o alelo transmitido.

Ainda dentro da abordagem de famílias a amostra de pacientes foi dividida em dois sub-grupos: com e sem história familiar de TDAH (Tabela 4.4).

Tabela 4.4: Análise de associação do polimorfismo -1021 C/T do gene DBH através do HRR para dois subgrupos da amostra: com(HF+)<sup>a</sup> e sem história familiar de TDAH (HF-)<sup>b</sup>.

Alelos	HF+			HF-		
	T	C	Total	T	C	Total
Transmitidos	18	39	57	29	67	96
Não Transmitidos	10	47	57	21	75	96
Total	28	86	114	50	142	192

a= 33 pacientes de 24 trios e 9 duplas;  $p=0,107$ .

b= 48 pacientes (somente trios);  $p= 0,221$ .

Não foi possível detectar um efeito predominante em nenhum dos sub-grupos. Isto provavelmente se deve a redução da amostra, bastante relevante nos dois casos. Analisando somente o sub-tipo combinado do TDAH

conforme mostrado na tabela 4.5 também não foi possível detectar um efeito significativo.

Tabela 4.5: Análise de associação do polimorfismo -1021 C/T do gene DBH através do HRR para o sub-grupo da amostra com pacientes do tipo combinado<sup>a</sup>.

Alelos	T	C	Total
Transmitidos	39	86	125
Não Transmitidos	29	96	125
Total	68	182	250

<sup>a</sup>= 69 pacientes de 56 trios e 13 duplas;  $p= 0,181$ .

Este dado também pode ser devido à diminuição do tamanho amostral. No entanto, os resultados em geral parecem indicar que o gene está influenciando a amostra como um todo e não um sub-tipo clínico específico. Assim, o presente estudo sugere um papel importante do gene que codifica a enzima dopamina beta-hidroxilase na suscetibilidade genética ao TDAH.

Os tradicionais estudos caso-controle são mais sujeitos a efeitos de estratificação populacional, visto que a maioria dos marcadores genéticos é muito variável entre diferentes populações e etnias. É possível, então, que isto se torne um fator de confusão na análise dos dados, gerando resultados falso-positivos se não detectado antes da investigação. Os estudos baseados em famílias têm a vantagem de evitar grande parte deste problema, visto que o controle ao probando é feito dentro do próprio núcleo familiar (ALSOBROOK e PAULS, 1998; STATE e cols., 2000). Este fato, juntamente com a possibilidade de se obter núcleos familiares completos através dos pacientes impulsionou o uso desses métodos em detrimento aos estudos caso-controle

(PRITCHARD e cols., 2000). Porém, a redução de poder estatístico questiona a aplicação irrestrita das abordagens baseadas em família. Este método poderia gerar falso-negativos não conseguindo detectar um efeito pequeno, que é típico para os genes que influenciam doenças multifatoriais.

SCHULZE e cols. (2001) comparando duas amostras de pacientes com transtorno bipolar, uma destinada para o estudo caso-controle e outra para o estudo de famílias, propuseram uma "volta" aos estudos caso-controle. Estes autores sugeriram que o uso apenas de famílias pode levar a perda de informação clínica e a um viés de seleção de genes de suscetibilidade. Segundo estes autores, estudos caso-controle tradicionais, aperfeiçoados por técnicas que aumentam o controle sobre a estrutura genética da população, parecem ser a melhor estratégia. É possível que estes novos desenhos de estudos caso-controle sejam um complemento muito útil aos métodos de famílias, e que o uso de ambos seja a estratégia mais poderosa para a análise genética de transtornos complexos como o TDAH (BACANU e cols., 2000; PRITCHARD e cols., 2000).

No presente estudo ambas abordagens demonstraram resultados significativos ou muito próximos do nível de significância. Levando em conta que a utilização de diferentes métodos foi sugerida como uma boa estratégia para estudos de associação os resultados foram bastante consistentes.

Os dados deste trabalho vão ao encontro dos estudos descritos por DALY e cols.(1999) e ROMAN e cols.(2002). Estes autores identificaram uma associação do polimorfismo Taq I, localizado no íntron 5 do gene DBH, com o TDAH através do método de famílias. Ambas investigações sugeriram o gene DBH como um importante gene de suscetibilidade ao TDAH. A associação

verificada no presente estudo sugere que o polimorfismo da região promotora possivelmente esteja em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo TaqI. Esta possibilidade, no entanto, deverá ser confirmada.

Em uma outra perspectiva, os resultados deste trabalho se mostraram bastante condizentes com trabalho de ZABETIAN e cols.(2001). Estes autores identificaram o próprio loco DBH como o principal loco controlador da atividade plasmática da enzima DBH. Além disto, o polimorfismo -1021C/T, investigado neste estudo, foi sugerido pelos autores como responsável por 35 a 52% da atividade da enzima. ZABETIAN e cols. (2001) sugeriram ainda um modelo de herança mendeliana co-dominante para o polimorfismo em questão. Os homozigotos para o alelo C teriam atividade enzimática mais elevada, os heterozigotos teriam uma atividade intermediária e os homozigotos para o alelo T teriam uma atividade mais baixa. O alelo T foi justamente o alelo com o qual se verificou associação com o TDAH no presente estudo.

A partir destes dados seria possível corroborar com a hipótese dopaminérgica, onde alguns sintomas do transtorno seriam causados por uma hipofunção dopaminérgica, uma vez que se a enzima que converte dopamina em noradrenalina com sua atividade baixa poderia ser indicativo de menores quantidades de dopamina disponível.

O gene DBH parece ser importante na suscetibilidade ao TDAH e os resultados deste trabalho indicam que o polimorfismo -1021C/T parece ser promissor para futuras investigações. No entanto, mais estudos com este polimorfismo são necessários para confirmar seu papel no TDAH, pois este é o primeiro estudo de associação deste polimorfismo com o transtorno.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALSOBROOK, J.P., II; PAULS, D.L. 1998. Molecular approaches to child psychopathology. *Hum Biol* 70: 413-432.

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

ARNSTEN, A F.T.; STEERE, J.C.; HUNT, R.D. 1996. The contribution of alpha 2- noradrenergic mechanisms to prefrontal cortical cognitive function: Potential significance for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry* 53: 448-455.

BACANU, S. A.; DEVLIN, B.; ROEDER, K. 2000. The power of genomic control. *Am J Hum Genet* 66: 1933-1944.

BIEDERMAN, J; MILBERGER, S; FARAONE, S.V; KIELY, K; GUILTE, J; MICK, E; ABLON, J.S; WARBURTON, R; REED, E; DAVIS, S.G. 1995b. Impact of adversity on functioning and comorbidity in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 34: 1495-1504.

BIEDERMAN, J. 1988. Attention-deficit/hyperactivity disorder: A life span perspective. *J Clin Psychiatry* 59 (Supplement 7): 4-16.

BIEDERMAN, J.; FARAONE, S.V.; KEENAN, K.; BENJAMIN, J.; KRIFCHER, B.; MOORE, C.; SPRICH-BUCKMINSTER, S.; UGAGLIA, K.; JELLINEK, M.S.; STEINGARD, R.; SPENCER, T.; NORMAN, D.; KOLODNY, R.; KRAUS, I.; PERRIN, J.; KELLER, M.B.; TSUANG, M. T. 1992. Further evidence for family-genetic risk factors in attention-deficit/hyperactivity disorder: Patterns of comorbidity in probands and relatives in psychiatrically and pediatrically referred samples. *Arch Gen Psychiatry* 49: 728-738.

CASTELLANOS, F.X. 1977. Toward a pathophysiology of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Clin Pediatr* 36: 381-393.

COMINGS, D.E.; GADE-ANDAVOLU, R; GONZALES, N.; BLAKE, H.; WU, S.; MacMURRAY, J.P. 1999. Additive effect of three noradrenergic genes (ADRA2A, ADRA2C, DBH) on attention-deficit/hyperactivity disorder and learning disabilities in Tourette syndrome subjects. *Clin Genet* 55:160-172.

COOK, E.H.; STEIN, M.A.; KRASOWSKI, M.D.; COX, N.J.; OLKON, D.M.; KIEFFER, J.E.; LEVENTHAL, B.L. 1995. Association of attention deficit disorder and the dopamine transporter gene. *Am J Hum Gen* 56:993-998.

CURRAN, S.; MILL, J; TAHIR, E.; KENT, I.; RICHARDS, S.; GOULD, A; HUCKET, I.; SHARP, J.; BETTEN, C.; FERNANDO, S.; OZBAY, F.; YAZGAN Y.; SIMONOFF, E.; THOMPSON, M.; TAYLOR, E.; ASHERSON, P. 2001. Association study of a dopamine transporter polymorphism and attention-deficit/hyperactivity disorder in UK and Turkish samples. *Mol Psychiatry* 6:425-428.

CURRAN, S.; MILL, J.; SHAM, P.; RIJSDIJK, F.; MARUSIC, K.; TAYLOR, E.; ASHERSON, P. 2001b. QTL association analysis of the DRD4 exon 3 VNTR polymorphism in a population sample of children screened with a parent rating scale for ADHD symptoms. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)* 105: 387-393.

DALY, G.; HAWI, Z.; FITZGERALD, M.; GILL, M. 1999. Mapping susceptibility loci in attention-deficit/hyperactivity disorder: Preferential transmission of parental alleles at DAT1, DBH and DRD5 to affected children. *Mol Psychiatry* 4: 192-196.

DIMAIO, S.; GRIZENKO, N.; JOOBER, R. 2003. Dopamine genes and attention deficit hyperactivity disorder: a review. *J Psychiatry Neurosci* 28 (1): 27-38.

EPSTEIN, J.N.; CONNERS, C.K.; ERHARD, T.D.; ARNOLD, L.E.; HECHTMAN, L.; HINSHAW, S.P.; HOZA, B.; NEWCORN, J.H.; SWANSON, J.M.; VITIELLO, B. 2000. Familial aggregation of ADHD characteristics. *J. Abnormal Child Psychol* 28: 585-594.

FARAONE, S.V.; BIEDERMAN, J.; CHEN, W.J.; KRIFCHER, B.; KEENAN, K.; MOORE, C.; SPRICH, S.; TSUANG, M.T. 1992. Segregation analysis of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychiatr Genet* 2: 257-275.

FARAONE, S.; BIEDERMAN, J.; WEBER, W.; RUSSELL, R.L. 1998. Psychiatric, neuropsychological, and psychosocial features of DSM-IV subtypes of

attention-deficit/hyperactivity disorder: Results from a clinically referred sample. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 37:185-193.

FARAONE, S.V; DOYLE, A.E; MICK, E; BIEDERMAN, J. 2001. Meta-analysis of the association between the dopamine D4 gene 7-repeat allele and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* 158: 1052-1057.

LaHOSTE, G.J.; SWASON, J.M.; WIGAL, S.B.; GLABE, C.; WIGAL, T.; KING, N.; KENNEDY, J.L. 1996. Dopamine D4 receptor gene polymorphism is associated with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 1: 121-124.

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

LEVY, F.; BARR, C.; SUNOHARA, G. 1998. Directions of aetiologic research on attention-deficit/hyperactivity disorder. *Aust N Z J Psychiatry* 32: 97-103.

MAHER, B.S.; MARAZITA, M.L.; MOSS, H.B.; VANYUKOV, M.M. 1999. Segregation analysis of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)* 88:71-78.

MAHER, B.S; MARAZITA, M.L; FERRELL, RE et al. 2002. Dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis. *Psychiatr Genet* 12 (4): 207-15.

MICK, E; BIEDERMAN, J; FARAONE, S.V; SAYER, J; KLEINMAN S.E. 2002. Case-control study of ADHD and maternal smoking, alcohol use, and drug use during the pregnancy. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 41: 378-385.

NIGG, J.T.; GOLDSMITH, H.H. 1998. Developmental psychopathology, personality, and temperament: Reflections on recent behavioral genetics research. *Hum Biol* 70: 387-412.

OVARSCHER, H. 1985. Psychiatric interviews suitable for use in research with children and adolescents. *Psychopharmacol bull* 21: 737-744.

PLISZKA, S.R.; McCRACKEN, J.T.; MAAS, J.W. 1996. Catecholamines in attention-deficit/hyperactivity disorder: Current perspectives. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 35: 264-272.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; ROSENBERG, N.A.; DONNELLY, P. 2000. Association mapping in structured populations. *Am J Hum Genet* 67: 170-181.

QUIST, J.F.; KENNEDY, J.I. 2001. Genetics of childhood disorders: XXIII. ADHD, part 7: The serotonin system. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 40: 253-256.

RHODE, L. A.; BIEDERMAN, J.; BUSNELLO, A.; ZIMMERMANN, H.; SCHMITZ, M.; MARTINS, S.; TRAMONTINA, S. 1999. ADHD in a school sample of Brazilian adolescents: A study of prevalence, comorbid conditions, and impairments. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 38: 716-722.

ROMAN, T; SCHMITZ, M; POLANCZYK, G; EIZIRIK, M; ROHDE, L.A; HUTZ, M.H. 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: 471-478.

ROMAN, T; SCHMITZ, M; POLANCZYK, G.V; EIZIRIK, M; ROHDE, L.A; HUTZ, M.H. 2002. Further evidence for the association between attention-deficit/hyperactivity disorder and the dopamine-beta-hydroxylase gene. *Am J Med Genet* 114: 154-158.

SATTERFIELD, J.H.; DAWSON, M.E. 1971. Electrodermal correlates of hyperactivity in children. *Psychophysiology* 8: 191-197.

SCHULZE, T.G.; KRAUSS, H.; GROSS, M.; BAUER, I.; FANGERAU-LEFÈVRE, H.; ILLES, F.; OHLRAUN, S.; FIMMERS, R.; CICHON, S.; HELD, T.; PROPPING, P.; NÖTHEN, M.M.; MAIER, W.; RIETSCHER, M. 2001. Caught in the trio trap? Potential selection bias inherent to association studies using parent-offspring trios. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)* 105: 351-353.

SEEMAN, P.; MADRAS, B.K. 1998. Anti-hyperactivity medication: Methylphenidate and amphetamine. *Mol Psychiatry* 3: 745-753.

SMALEY, S.L. 1997. Genetic influences in childhood-onset psychiatric disorders: Autism and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Hum Genet* 60: 1267-1282.

SMALEY, S.L.; McCOUGH, J.J.; Del' HOMME, M.; NewDELMAN, J.; GORDON, E.; KIM, T.; LIU, A.; McCracken, J.T. 2000. Familial clustering of symptoms and disruptive behaviors in multiple families with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 39: 1135-1143.

STATE, M.W.; LOMBROSO, P.J.; PAULS, D.L.; LECKMAN, J.F. 2000. The genetics of childhood psychiatric disorders: A decade of progress. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 39: 946-962.

SWANSON, J.M.; SERGEANT, J.A.; TAYLOR, E.; SONUGA-BARKE, E.J.S.; JENSEN, P.S.; CANTWELL, D.P. 1998a. Attention-deficit/hyperactivity disorder and hyperkinetic disorder. *Lancet* 351: 429-433.

SWANSON, J.M.; CASTELLANOS, F.X.; MURIAS, M.; LaHOSTE, G.; KENNEDY, J. 1998b. Cognitive neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorder and hyperkinetic disorder. *Curr Opin Neurobiology* 8:263-271.

TANNOCK, R. 1998. Attention-deficit/hyperactivity disorder: Advances in cognitive, neurobiological, and genetic research. *J Child Psychol Psychiat* 39: 65-99.

TERWILLIGER, J.; OTT, J. 1992. A haplotype-based "haplotype relative risk" approach to detecting allelic associations. *Hum Hered* 42: 337-346.

THAPAR, A.; HOLMES, J.; POULTON, K.; HARRINGTON, R. 1999. Genetic bases of attention-deficit and hyperactivity. *Br J Psychiatry* 174: 105-111.

TOOD, R.D. 2000a.; Genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: Are we ready for molecular genetic studies? *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)* 96: 241-243.

TOOD, R.D. 2000b.; Genetics of childhood disorders : XXI. ADHD, part 5: A behavioral genetic perspective. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 39: 1571-1573.

VAIDYA, C.J.; AUSTIN, G.; KIRKORIAN, G.; RIDLEHUBER, H.W.; DESMOND, J.E.; GLOVER, G.H.; GABRIELI, J.D.E. 1998. Selective effects of methylphenidate in attention-deficit/hyperactivity disorder: A functional magnetic resonance study. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14494-14499.

WALDMAN, I.D.; ROWE, D.C.; ABRAMOWITZ, A.; KOZEL, S.T.; MOHR, J.H.; SHERMAN, S.L.; CLEVELAND, H.H.; SANDERS, M.L.; GARD, J.M.C.; STEVER, C. 1998. Association and linkage of the dopamine transporter gene (DAT1) and attention-deficit/hyperactivity disorder in children. *Am J Hum Genet* 63: 1767-1776.

WENDER, P.H.; WOLF, L.E.; WASSERTEIN, J. 2001. Adults with ADHD. Na overview. *Ann N Y Acad Sci* 931: 1-16.

WIGG, K. et al. 2002. Attention-deficit/hyperactivity disorder and the gene for dopamine beta-hydroxylase. *Am J Psychiatry* 159: 1046-1048.

WU, S.; MUHLEMAN, D.; COMINGS, D. 1997. PCR amplification of the *Taq I* B1/B2 polymorphism at intron 5 of the dopamine  $\beta$ -hydroxylase gene. *Psychiatr Genet* 7: 39-40.

ZABETIAN, C.P.; ANDERSON, G.M.; BUXBAUM, S.G.; ELSTON, R.C.; ICHINOSE, H.; NAGATSU, T.; KIM, K.; KIM, C.; MALISON, R.C.; GELERNTER, J.; CUBBELS, J.F. 2001. A quantitative-trait analysis of human plasma-dopamine  $\beta$ -hydroxylase activity: Evidence for a major functional polymorphism at the DBH locus. *Am J Hum Genet* 68: 515-522.

ZABETIAN, C.P.; BUXBAUM, S.G.; ELSTON, R.C.; KÖHNKE, M.D.; ANDERSON, G.M.; GELERNTER, J.; CUBBELS, J.F. 2003. The structure of linkage disequilibrium at the DBH locus strongly influences the magnitude of association between diallelic markers and plasma dopamine  $\beta$ -hydroxylase activity. *Am J Hum Genet* 72: 1389-1400.