

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Biociências  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**O POLIMORFISMO MRI180V NO GENE DO RECEPTOR  
MINERALOCORTICÓIDE E O TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E  
HIPERATIVIDADE (TDAH) EM ADULTOS.**

**Gustavo Lucena Kortmann**

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

Orientador: Prof. Dr. Claiton H. D. Bau

Porto Alegre, Março de 2011.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Humana Molecular do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**Instituições financiadoras:**

CNPq

FAPERGS

PRONEX

## **Agradecimentos**

**Ao meu professor e amigo Claiton Bau**, pelos ensinamentos, paciência, puxões de orelha e cafezinhos durante o artigo;

**À minha namorada Maikel**, pelo carinho, amor, companhia e paciência, sobretudo nas horas em que me ausentei devido ao estudo;

**À minha família**, pelo amor, apoio e incentivo aos estudos e à leitura desde pequeno;

**Aos colegas do Departamento de Genética**, pela experiência compartilhada, eventual solidariedade de reagentes e almoços no RU e cafés no “Chiques”;

**Aos amigos do Laboratório 109**, pela companhia, pelas risadas, por toda a ajuda e apoio em todos os momentos dentro e fora do Laboratório;

**Ao Elmo**, pela assessoria integral (mesmo durante suas férias) nas questões burocráticas e departamentais;

**A todos os professores que me auxiliaram**, de alguma forma, na construção dessa caminhada, sobretudo à professora Marion Schiengold, pela amizade e conselhos acadêmicos.

## Sumário

Resumo.....	5
Abstract.....	6
<i>Capítulo 1</i> <i>Introdução.....</i>	<i>7</i>
1.1 Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH).....	8
1.2 Etiologia.....	10
1.3 O fenótipo TDAH – personalidade e comorbidades.....	11
1.4 A fisiologia do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA).....	13
1.5 O TDAH e a resposta ao estresse.....	14
1.6 O receptor mineralocorticóide (MR).....	15
1.7 O gene do receptor mineralocorticóide (NR3C2) e o polimorfismo MRI180V.....	17
<i>Capítulo 2</i> <i>Justificativas, objetivos e aspectos éticos.....</i>	<i>18</i>
2.1 Justificativas.....	19
2.2 Objetivos.....	21
2.3 Aspectos Éticos.....	22
<i>Capítulo 3</i> <i>Manuscrito.....</i>	<i>23</i>
<i>Capítulo 4</i> <i>Discussão.....</i>	<i>44</i>
<i>Capítulo 5</i> <i>Referências Bibliográficas da Introdução e Discussão.....</i>	<i>48</i>
<i>Capítulo 6</i> <i>Anexos.....</i>	<i>60</i>

## Resumo

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) inclui sintomas de desatenção, impulsividade e hiperatividade acometendo aproximadamente 5% das crianças em idade escolar e 2,5% dos adultos. Um dos mecanismos fisiopatológicos propostos para o TDAH é uma resposta disfuncional ao estresse. O eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA) desempenha um importante papel na regulação dos neurotransmissores do sistema nervoso central e no comportamento, estando envolvido em funções relacionadas com atenção, emoção, aprendizado e memória. O receptor mineralocorticoide (MR) é o principal receptor envolvido no desencadeamento inicial da resposta ao estresse e tem um papel fundamental na modulação do eixo HPA. Por este motivo, o gene do MR (NR3C2) é um gene candidato para associação com o TDAH. Há evidências que o alelo Val do polimorfismo MRI180V (rs5522) esteja envolvido na vulnerabilidade a transtornos psiquiátricos e funções cognitivas. Nós testamos possíveis associações entre o MRI180V com o TDAH e com variáveis relacionadas em uma amostra brasileira de 478 pacientes adultos com TDAH e 597 doadores de sangue pareados quanto a variáveis demográficas. O polimorfismo MRI180V não está associado ao TDAH ( $\chi^2 = 2.71, P = 0.26$ ), mas portadores do alelo Val apresentaram escores mais elevados de desatenção ( $F = 5.5, P = 0.02$ ) e de hiperatividade/impulsividade ( $F = 6.47; P = 0.01$ ) comparados aos pacientes com TDAH não portadores do alelo. Apesar da viabilidade biológica desses resultados preliminares, estes devem ser vistos com cautela e aguardam por replicações.

## Abstract

Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) is a disorder of inattention, impulsivity, and hyperactivity which is prevalent in ~ 5% of school-aged children and persist in 2,5% of adults. One of the proposed pathophysiological mechanisms is a blunted stress response. The hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis plays an important role in the central nervous system neurotransmitters regulation and behavior, involved in biological functions such as attention, emotion, learning and memory. The mineralocorticoid receptor (MR) is the main receptor involved in the initial triggering of stress response. For this reason, the MR gene (NR3C2) is a candidate gene for association to ADHD. There is evidence that the Val allele of the MRI180V polymorphism (rs5522) is involved in the vulnerability to psychiatric disorders and cognitive functions. We tested the possible association between MRI180V with ADHD and comorbid psychiatric disorders in a Brazilian sample of 478 ADHD adult patients and 597 matched blood donors. The MRI180V polymorphism was not associated with ADHD ( $\chi^2 = 2.71$ ,  $P = 0.26$ ), but carriers of the Val allele presented slightly higher inattention ( $F = 5.5$ ,  $P = 0.02$ ) and hyperactivity/impulsivity ( $F = 6.47$ ;  $P = 0.01$ ) scores compared to ADHD patients non-carriers. Despite of the biological plausibility of these findings, these preliminary results should be viewed with caution and wait for replications.

## **Capítulo 1**

### **Introdução**

## **1.1. Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH)**

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), conforme a quarta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais (DSM-IV), é um transtorno psiquiátrico caracterizado pela presença de seis ou mais sintomas de desatenção e/ou seis ou mais sintomas de hiperatividade/impulsividade, por no mínimo 6 meses, e prejuízo em pelo menos dois contextos ambientais diferentes (APA, 1994). Desde que foi descrito pela primeira vez por Still em 1902 (Still, 1902), o TDAH recebeu diversos outros nomes, como “lesão cerebral mínima”, “disfunção cerebral mínima”, “síndrome da criança hiperativa”, “reação hipercinética da infância”, “transtorno de déficit de atenção e hiperatividade”, dentre outros (Adler, 2008). Embora o TDAH tenha sido considerado, por algumas décadas, como um transtorno mais prevalente na América do Norte, sabe-se que este é um transtorno que ocorre em todo o mundo (Faraone e cols., 2003; Polanczyk e cols., 2007).

Apesar de existir na literatura uma ampla variação em termos de prevalência do TDAH – decorrente principalmente das diferentes metodologias individuais empregadas - (Faraone e cols., 2006; Fayyad e cols., 2007; Polanczyk e cols., 2007), estudos de meta-análise apontaram uma prevalência do TDAH de 5,3% para crianças e adolescentes (Polanczyk e cols., 2007) e 2,5% para os adultos (Simon e cols., 2009). Dessa forma, muitos adultos diagnosticados como tendo o transtorno, já apresentavam diagnóstico positivo, ou manifestavam alguns sintomas, quando crianças (Biederman e cols., 1997). Segundo Kessler e cols. (2006), 70% dos indivíduos que tiveram TDAH na infância alegaram que continuaram com o transtorno quando adultos. Histórico familiar de TDAH, comorbidades psiquiátricas e adversidades psicossociais



têm sido apontados como alguns fatores que contribuem para a persistência do transtorno em adultos (Biederman e cols., 1995).

Paralelamente ao decréscimo na prevalência do TDAH em adultos, quando comparados com as crianças, há uma diferença na proporção de afetados quanto ao sexo. Enquanto que em amostras clínicas de crianças a proporção de afetados varia de 6 meninos para 1 menina até 9 meninos para 1 menina (Gittelman e cols., 1985; Weiss e cols., 1985, Arnold, 1996; Faraone e cols., 1998), em adultos a razão entre homens e mulheres é próxima de 1:1 (Wender e cols., 1985; Murphy e Barkley, 1996).

Segundo o DSM-IV, o TDAH pode ser dividido em três subtipos clínicos de acordo com os sintomas apresentados pelo paciente. Quando apresenta seis ou mais sintomas do grupo de desatenção, o indivíduo é classificado como predominantemente desatento; quando apresenta seis ou mais sintomas do grupo de hiperatividade, como predominantemente hiperativo-impulsivo e se apresentar seis ou mais sintomas em cada um dos grupos, o indivíduo é considerado do subtipo combinado. Um estudo prévio envolvendo uma parcela da presente amostra revelou que 53,5% dos pacientes apresentavam o subtipo combinado do TDAH, 40% o subtipo predominantemente desatento e 6.5% o subtipo predominantemente hiperativo (Grevet e cols., 2006). As frequências para cada subtipo estão de acordo com as relatadas na literatura (Millstein e cols., 1997; Murphy e cols., 2002).

Enquanto os pacientes do subtipo combinado apresentam maiores índices de agressividade que o subtipo predominantemente desatento (Crystal e cols., 2001), estes últimos apresentam maior isolamento social e retraimento, bem como maiores taxas de depressão e ansiedade (Biederman, 1998; Pfiffner e cols., 2000).

## 1.2. Etiologia

O TDAH tem uma etiologia multifatorial, ou seja, fatores genéticos e fatores ambientais interagem de maneira complexa para o seu desenvolvimento (Biederman, 2005). Estudos em gêmeos demonstraram uma herdabilidade média para o TDAH de 76% (Faraone e cols., 2005), caracterizando-o como sendo um dos mais herdáveis dentre os transtornos psiquiátricos. Neste sentido, estudos de ligação em famílias (Vegt e cols., 2009), varreduras genômicas de associação (GWAS) (Franke e cols., 2009) e estudos de genes candidatos (Faraone e Khan, 2006; Gizer e cols., 2009) têm buscado identificar e caracterizar genes de interesse (Albayrak e cols., 2008). Até o momento, as varreduras genômicas de associação em TDAH não detectaram nenhuma associação significativa após correção para comparações múltiplas, e apresentaram baixo grau de sobreposição de resultados (Lasky-Su e cols., 2008; Lesch e cols., 2008; Neale e cols., 2008; Sonuga-Barke e cols., 2008; Mick e cols., 2010; Neale e cols., 2010).

Gizer e colaboradores (2009) - em uma ampla meta-análise da literatura sobre os estudos de associação envolvendo genes candidatos para o TDAH – identificaram associações significativas para vários genes: gene do transportador da dopamina (DAT1), gene do receptor D4 de dopamina (DRD4), gene do receptor D5 de dopamina (DRD5), gene do transportador de serotonina (5HTT), gene do receptor 1B de serotonina (HTR1B) e proteína associada ao sinaptossomo (SNAP25). Além disso, a heterogeneidade entre diferentes estudos foi significativa para associações entre TDAH e os genes DAT1, DRD4, DRD5, dopamina beta-hidroxiase (DBH), receptor adrenérgico-alfa-2A (ADRA2A), 5HTT, triptofano hidroxiase (TPH2), monoamina oxidase A (MAOA) e SNAP25 (Gizer e cols., 2009).

Essa notável heterogeneidade de resultados obtidos em diferentes estudos de associação envolvendo um mesmo gene e fenótipo – e que não é exclusiva dos estudos envolvendo transtornos psiquiátricos - é decorrente não só das diferenças de metodologia empregadas entre os estudos, mas também da heterogeneidade alélica comum aos transtornos multifatoriais. Dessa forma, embora Gizer e cols. (2009) tenham encontrado associações significativas entre o TDAH e os genes supracitados, certamente existem outros genes de baixa penetrância associados ao transtorno que nunca ou raramente foram estudados, o que confere importância à necessidade de se estudar outros genes candidatos além dos classicamente averiguados.

Além dos fatores genéticos, alguns fatores ambientais foram apontados como tendo influência no desencadeamento do transtorno. Complicações na gravidez e no parto, tabagismo, uso de álcool e de outras substâncias durante a gravidez e variáveis ambientais adversas na família são considerados fatores de risco importantes para o desenvolvimento do TDAH (Biederman, 2005; Button e cols., 2005; Bhatara e cols., 2006; Banerjee e cols., 2007).

### **1.3. O fenótipo TDAH – personalidade e comorbidades**

Uma das perspectivas abertas pelos estudos de associação do tipo caso-controle é a exploração de fenótipos intermediários entre o efeito do gene e o transtorno mental propriamente dito. Na genética psiquiátrica, o termo mais usado para essas características é o de endofenótipos. Eles podem ser definidos como traços intermediários em uma cadeia de causalidade com origens genéticas, tendo por desfecho um transtorno multifatorial (Gunzerath

e Goldman, 2003). Esse tipo de investigação gera uma perspectiva para tentar minimizar a perda de poder estatístico gerada pela heterogeneidade fenotípica. Ou seja, pode ser mais fácil identificar o papel de um gene se trabalhado com um fenótipo mais diretamente relacionado à influência genética do que o diagnóstico em si.

No presente estudo, a variável considerada como um possível endofenótipo é a personalidade. Em 1993, Cloninger e cols. propuseram um modelo para a estrutura e desenvolvimento da personalidade, o qual consta de dimensões de temperamento e de caráter. Segundo esse modelo, existem quatro dimensões de temperamento independentemente herdáveis e que se manifestam já nos primeiros anos de vida: procura por novidades, evitação de dano, dependência de recompensa e persistência. Por outro lado, as dimensões de caráter (auto-direcionamento, cooperatividade e auto-transcendência) amadurecem na idade adulta e são mais relacionados a um aprendizado introspectivo (Cloninger e cols., 2003). Há evidências de que as dimensões de personalidade estejam correlacionadas com subtipos do TDAH. Um estudo prévio envolvendo uma parcela da nossa amostra demonstrou que o subtipo combinado do TDAH está associado com maiores escores de procura por novidades e menores escores de cooperatividade que o subtipo desatento. Da mesma forma, maiores escores de desatenção estão associados com menor auto-direcionamento e maior evitação de dano (Salgado e cols., 2009).

Outra perspectiva de redução da heterogeneidade fenotípica é a busca pelos chamados fenótipos refinados. Nesse contexto, poderia ser identificada a associação entre um polimorfismo e um subgrupo muito específico de pacientes. Comorbidade é o termo utilizado para designar a ocorrência de dois ou mais transtornos em um mesmo indivíduo (Rohde e Mattos, 2003). Os portadores de TDAH apresentam uma frequência muito elevada de várias

comorbidades, tais como transtorno opositor desafiante, transtorno de personalidade anti-social, depressão maior, transtorno bipolar, transtorno de uso de substâncias e múltiplas ansiedades (Grevet e cols., 2006). Assim, o refinamento do fenótipo TDAH em adultos pode ajudar a identificar fatores de vulnerabilidade específicos desse transtorno, os quais muitas vezes se sobrepõe aos das comorbidades associadas.

#### **1.4. A fisiologia do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA)**

O eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal desempenha um importante papel na regulação dos neurotransmissores do sistema nervoso central e no comportamento, influenciando em questões tais como atenção, emoção, aprendizado e memória (Turner-Cobb, 2005; Marquez e cols., 2006).

Diante de condições estimulatórias, como um desafio, por exemplo, os neurônios nos núcleos paraventriculares do hipotálamo secretam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) na circulação hipofisária. Na hipófise anterior, o CRH estimula a produção do hormônio corticotrofina (ACTH) que é lançado na circulação sistêmica para estimular a produção e liberação de cortisol a partir do córtex da adrenal. O controle inicial dos níveis de cortisol no sangue é mediado por 2 receptores, o receptor mineralocorticóide (MR), de alta afinidade e o receptor glicocorticóide, de baixa afinidade (GR). Diante de condições basais, os baixos níveis de cortisol no cérebro ocupam um número substancial de MR e alguns GR (devido à maior afinidade do cortisol pelo MR). Quando ocorre uma situação de estresse, o aumento repentino da biodisponibilidade de cortisol satura rapidamente os MR ainda

disponíveis. Dessa forma, os GR se ligam ao cortisol principalmente quando os MR já estão saturados (de Kloet e cols., 2005). O cortisol elevado no plasma começa imediatamente a interagir com os receptores corticóides (mineralocorticóide e glicocorticóide) para inibir a via de resposta ao estresse (Talge e cols., 2007). Assim, os corticóides exercem uma retroalimentação na regulação do eixo HPA em vários níveis, incluindo a hipófise, hipotálamo e estruturas límbicas como o hipocampo (de Rijk, 2009).

Normalmente, quando os níveis de cortisol sanguíneo decrescem, através de regulação por retroalimentação negativa do eixo HPA por meio da liberação de CRH e ACTH na hipófise e hipotálamo, o eixo HPA consegue manter os níveis de cortisol estáveis.

### **1.5. O TDAH e a resposta ao estresse**

Recentemente, o eixo HPA tem sido apontado como uma variável a ser estudada dentro do TDAH (van West e cols., 2009; Ma e cols., 2011). Tem-se sugerido que indivíduos com TDAH apresentam uma resposta imprópria ao estresse (King e cols., 1998; Ma e cols., 2011). O nível de cortisol basal tanto em crianças (Ma e cols., 2011) quanto em adultos (Lackschewitz e cols., 2008) com TDAH é significativamente menor do que em indivíduos normais. Esses níveis podem ser ainda menores em crianças do subtipo hiperativo/impulsivo do TDAH (Blomqvist e cols., 2007; Ma e cols., 2011). Esses baixos níveis de cortisol no TDAH poderiam refletir a sub-reatividade do HPA (Ma e cols., 2011) ou um limite de detecção elevado diante de agentes estressores (Kariyawasam e cols., 2002). A variação

genética é responsável por grande parte desta variabilidade na resposta ao estresse (de Rijk, 2009).

### **1.6. O receptor mineralocorticóide (MR)**

O receptor mineralocorticóide é um dos principais envolvidos no controle e modulação da secreção de cortisol. Está presente nos órgãos periféricos que são alvo da aldosterona (glândulas sudoríferas, cólon distal, rins e glândulas salivares), atuando na regulação da homeostase de sal no organismo. O receptor também está presente nas áreas límbicas do cérebro, onde possui uma alta afinidade pelo cortisol, um glicocorticóide responsável pelas respostas fisiológicas relacionadas ao estresse (Reul e de Kloet, 1985; de Kloet e cols., 2005; de Rijk e cols., 2008). Além disso, sabe-se que em condições como estresse e envelhecimento, a expressão de mRNA dos MR no hipocampo é diminuída (Schmidt e cols., 2003; Noorlande e cols., 2006).

Quando existe um desbalanço entre as funções do receptor mineralocorticóide em relação ao dos receptores glicocorticóides, ocorre um prejuízo na sinalização mediada pelo cortisol com as estruturas que controlam o aprendizado, memória e comportamento durante o desafio (de Kloet e cols., 2005; 2007). Quanto às funções cognitivas, estudos em animais têm demonstrado que os MR estão envolvidos na interpretação de novas informações (Oitzl e de Kloet, 1992; Sandi e Rose, 1994; Berger e cols., 2006), recuperação da memória (Yau e cols., 1995; Conrad e cols., 1997), e aprendizado visoespacial (Yau e cols., 1995; Douma e cols., 1998; Yau e cols., 1999). Em homens, o bloqueio de MR por meio de um antagonista

acarretou prejuízo na atenção seletiva, memória visoespacial e flexibilidade mental (Otte e cols., 2007).

O mecanismo de ação do receptor mineralocorticóide ainda não é totalmente conhecido (Rashid e Lewis, 2005). O que se conhece desse mecanismo até o momento deriva do modelo de ação do hormônio esteróide (Rashid e Lewis, 2005). O cortisol circula pelo sangue através de globulinas ligantes de corticóides, entra na célula por difusão simples e se liga aos receptores corticóides (mineralocorticóide e glicocorticóide) no citoplasma e no núcleo. A interação do cortisol com os receptores resulta na dimerização e mudanças conformacionais, aumentando a afinidade desse complexo por sequências no DNA chamadas elementos de resposta a corticóides (sequências de nucleotídeos semi-palindrômicos separados entre si por três bases nucleotídicas). Receptores ativados de mineralocorticóides, glicocorticóides, progesterona e andrógenos compartilham o mesmo elemento de resposta. Uma vez que o cortisol se liga ao elemento de resposta, esse complexo induz mudanças na transcrição de genes alvos, na tradução de mRNA em novas proteínas e na função celular geral (Rashid e Lewis, 2005). Recentemente, foi descrito um papel desse receptor na mediação de sinapses excitatórias, localizado na membrana celular de neurônios do hipocampo (isto é, uma localização adicional à citoplasmática e nuclear descrita acima) onde mediará efeitos rápidos e transitórios na estimulação (Haller e cols., 2008).

A extensa variabilidade na resposta ao estresse pode em princípio, e pelo menos em parte, ser explicada pelas variantes gênicas funcionais do receptor mineralocorticóide, as quais modulam não só os níveis basais de cortisol e as respostas do eixo HPA, mas também influenciam nas respostas autônomas como, por exemplo, o aumento dos batimentos cardíacos (de Rijk e cols., 2006, 2008).



## 1.7. O gene do receptor mineralocorticóide (NR3C2) e o polimorfismo MRI180V

O gene do receptor mineralocorticóide está localizado no cromossomo 4q31.1 e sua região codificante é formada pelos éxons 2-9. Estudos de varredura genômica identificaram a região genômica do gene NR3C2 como relevante para inteligência (Pan e cols., 2011) e para a gravidade do tabagismo (Berrettini e cols., 2008). Dentre os vários polimorfismos descritos especificamente para este gene (Arai e cols., 2003, Zennaro e Lombes, 2004), o SNP MRI180V (rs5522) é o mais estudado. Esse polimorfismo está localizado no éxon 2 do gene NR3C2 e caracteriza uma transição A>G, acarretando uma mudança de aminoácido de Isoleucina (ATT) para Valina (GTT) no códon 180 (de Rijk e cols., 2006). Estudos *in vitro* demonstraram que o alelo Val do polimorfismo MRI180V condiciona uma perda de função (Arai e cols., 2003; de Rijk e cols., 2006).

Os indivíduos que possuem o alelo Val têm níveis aumentados de batimentos cardíacos e maior biodisponibilidade de cortisol no plasma (de Rijk e cols., 2006). O alelo Val também foi associado com respostas do sistema nervoso autônomo e do sistema endócrino aumentadas diante de um estresse agudo (de Rijk e cols., 2006), com menor expressão gênica de MR induzida por cortisol (Arai e cols., 2003; de Rijk e cols., 2006), com sintomas depressivos geriátricos (Kuningas e cols., 2007), neuroticismo (de Rijk e cols., 2011) e com déficits de aprendizagem de recompensa (Bogdan e cols., 2010).

Assim, a função do polimorfismo MRI180V remete à hipótese de que a variação genética desse receptor possa atuar na gênese de alguns transtornos psiquiátricos, notadamente quando envolvem sintomas de ansiedade e depressão.

**Capítulo 2**  
**Justificativa, Objetivos e Aspectos Éticos**

## 2.1. Justificativa

Além das características principais do TDAH (desatenção, hiperatividade e impulsividade), freqüentemente o indivíduo afetado também tem prejuízos no desempenho acadêmico, relacionamentos familiar e social, ajustamento psicossocial e trabalho (Rohde e Mattos, 2003). Em mais de 50% dos casos existem comorbidades relacionadas com transtornos da aprendizagem, transtorno de conduta, abuso de substâncias e de álcool, e transtornos do humor e de ansiedade (Jensen e cols. 1997; Souza e cols. 2001). Essas comorbidades muitas vezes acabam sendo negligenciadas em estudos de associação com genes candidatos. Tendo em vista que os transtornos relacionados à ansiedade e depressão são comorbidades freqüentes no TDAH, que ambas comorbidades possuem uma herdabilidade compartilhada, e que potencialmente compartilham uma suscetibilidade relacionada ao controle genético da resposta aos fatores ambientais adversos (Kendler e cols., 1987), é possível que genes relacionados com essas comorbidades também estejam implicados na suscetibilidade ao TDAH.

O HPA é o componente central do sistema de resposta ao estresse, sendo responsável tanto pelo controle do ritmo circadiano, quanto pela reatividade ao estresse (de Kloet e cols., 2005). Recentemente, foi descrita uma função para o eixo HPA no TDAH (van West e cols., 2009; Ma e cols., 2011). Além disso, há evidências de que o alelo Val do polimorfismo MRI180V esteja envolvido na vulnerabilidade à depressão (Kuningas e cols., 2007) e a funções cognitivas (Otte e cols., 2007; Bogdan e cols., 2010). Uma vez que o MR é o principal receptor envolvido no desencadeamento da resposta ao estresse e na regulação do eixo HPA, o gene NR3C2 torna-se um candidato natural à associação com o TDAH e com comorbidades

relacionadas. No entanto, o papel de polimorfismos no gene NR3C2 nunca foi investigado no TDAH, justificando-se seu estudo.

## **2.2. Objetivos**

### **Geral**

O objetivo geral deste trabalho é verificar a associação do polimorfismo MRI180V do gene NR3C2 com o TDAH em adultos e variáveis clínicas relacionadas.

### **Específicos**

1. Investigar se há diferenças entre as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo MRI180V entre pacientes com TDAH e controles;
2. Analisar se há associações entre o polimorfismo estudado e a gravidade do TDAH, dimensões de personalidade e comorbidades psiquiátricas.

### **2.3. Aspectos Éticos**

Todos os pacientes com TDAH e controles assinaram um termo de consentimento informado (ANEXO A e B), os quais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (ANEXOS C e D).

### **Capítulo 3**

**Manuscrito em preparação**

**The mineralocorticoid receptor gene**

**MRI180V polymorphism and persistent**

**ADHD.**

**The mineralocorticoid receptor gene MRI180V polymorphism and persistent ADHD.**

Gustavo L. Kortmann<sup>1</sup>, Verônica Contini<sup>1</sup>, Guilherme Pinto Bertuzzi<sup>1</sup>, Nina Roth Mota<sup>1</sup>,  
Leandro L. de Lima<sup>1</sup>, Eugênio Horácio Grevet<sup>2</sup>, Eduardo Vitola<sup>2</sup>, Luis A. Rohde<sup>2</sup>, Paulo  
Belmonte-de-Abreu<sup>2</sup>, Claiton H. D. Bau<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Genetics Department, Biosciences Institute, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup> ADHD Section, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

**Correspondence:**

Prof. Claiton H. D. Bau

Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS

Caixa Postal: 15053

CEP: 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

Email: [claiton.bau@ufrgs.br](mailto:claiton.bau@ufrgs.br)

Telephone: (5551) 3308-6718

Fax: (5551) 3308-7311



## **ABSTRACT**

Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) is a disorder of inattention, impulsivity, and hyperactivity which is prevalent in ~ 5% of school-aged children and persist in 2,5% of adults. One of the proposed pathophysiological mechanisms is a blunted stress response. The mineralocorticoid receptor (MR) is the main receptor involved in the initial triggering of stress response. For this reason, the MR gene (NR3C2) is a candidate gene for association to ADHD. There is evidence that the Val allele of the MRI180V polymorphism (rs5522) is involved in the vulnerability to psychiatric disorders and cognitive functions. We tested the possible association between MRI180V with ADHD and comorbid psychiatric disorders in a Brazilian sample of 478 ADHD adult patients and 597 matched blood donors. The MRI180V polymorphism was not associated with ADHD ( $\chi^2 = 2.71$ ,  $P = 0.26$ ), but carriers of the Val allele presented slightly higher inattention ( $F = 5.5$ ,  $P = 0.02$ ) and hyperactivity/impulsivity ( $F = 6.47$ ;  $P = 0.01$ ) scores compared to ADHD patients non-carriers. Despite of the biological plausibility of these findings, these preliminary findings should be viewed with caution and wait for replications.

**Keywords:** ADHD, mineralocorticoid receptor, MRI180V, cortisol, stress.

## INTRODUCTION

The hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis is the central component of the stress system and is responsible for the control of the circadian rhythm and stress reactivity (de Kloet et al., 2005). HPA axis produces a cascade of hormones which results in cortisol secretion from the adrenal glands (Lovallo and Thomas, 2000). Thus, an improper HPA axis regulation is a vulnerability factor predisposing for disease (de Rijk, 2009). Compelling evidence suggests that the HPA axis is involved in major depressive (Rybakowski and Twardowska, 1999; Holsboer, 2001; Deshauer et al., 2003) and in anxiety disorders (Hastings et al., 2009). More recently, a role for HPA axis in attention-deficit hiperactivity disorder (ADHD) has been proposed (van West et al., 2009; Ma et al., 2011). ADHD is a disorder of inattention, impulsivity, and hyperactivity which is prevalent in ~ 5% of school-aged children (Faraone et al., 2006; Fayyad et al., 2007; Polanczyk et al., 2007) and persist in 2,5% of adults (Simon et al., 2009). The level of cortisol both in children (Ma et al., 2011) and adults (Lackschewitz et al., 2008) with ADHD was shown to be significantly lower than in normal individuals. This level can be even lower in children of the hyperactivity/impulsivity subgroup of ADHD (Blomqvist et al., 2007; Ma et al., 2011).

The mineralocorticoid receptor (MR) is involved in the onset of HPA regulation and stress response (de Kloet et al., 1998). It is present in the kidney cells, controlling the salt homeostasis which are aldosterone selective (de Kloet et al., 2000), and in brain, especially hippocampus, regulating the basal activity of the HPA and setting the threshold of activation of stress responsiveness (de Kloet et al., 1998; de Rijk et al., 2006). Although MR binds cortisol and aldosterone with similar affinity (Reul and de Kloet, 1985; Funder, 2004), brain

MR is mainly exposed to cortisol, which circulates at up to 1000-fold excess to aldosterone (de Rijk et al., 2006). MR is involved in anxiety and cognitive function (de Kloet et al., 2003). The blockade of MR with spironolactone (a MR-antagonist) in healthy men impairs several aspects of cognition, including selective attention (Otte et al., 2007).

The MR gene (NR3C2) is located on chromosome 4q31.1, with its coding region being formed by exons 2-9 (de Rijk et al., 2008). Common gene variants have been associated with several changes in HPA axis reactivity (de Rijk, 2009), including two MR polymorphisms: the MR-2G/C (rs2070951) and the MRI180V (rs5522). There is evidence that MRI180V is involved in the vulnerability for psychiatric disorders (Kuningas et al., 2007) and cognitive functions (Bogdan et al., 2010). This SNP is an A-G transition in exon 2 of the gene, at codon 180, resulting in an Isoleucine to Valine change (de Rijk, 2009). *In vitro* studies demonstrated that Val allele (MR 180V) implies a loss of function using cortisol as ligand (Arai et al., 2003; de Rijk et al., 2006). The Val allele has also been associated with heightened endocrine and autonomic responses to acute stress (de Rijk et al., 2006), diminished cortisol-induced MR gene expression (Arai et al., 2003; de Rijk et al., 2006), geriatric depressive symptoms (Kuningas et al., 2007) and reward learning deficits (Bogdan et al., 2010).

Despite the evidence suggesting the involvement of MR in attention and cognition processes (Otte et al., 2007; Bogdan et al., 2010), the role of MR polymorphisms in ADHD has never been investigated. This study tests the possible association between MRI180V with ADHD and comorbid psychiatric disorders.

## **MATERIAL AND METHODS**

### *Sample*

The ADHD sample included 478 adult patients that were recruited in the ADHD outpatient Program of the Clinical Hospital of Porto Alegre (HCPA). The mean age of the ADHD sample was 34 years ( $\pm 11.2$ ). The inclusion criteria were: a) Native-Brazilian of European descent; b) age 18 years or older and c) fulfillment of DSM-IV diagnostic criteria for ADHD (American Psychiatric Association, 1994), both currently and during childhood. The exclusion criteria were: a) evidence of clinically significant neurological diseases that might affect cognition (e.g., delirium, dementia, epilepsy, head trauma, multiple sclerosis); b) current or past history of psychosis and c) intelligence quotient (IQ)  $\leq 70$  (Kaplan et al., 1991).

The control sample was composed of 597 blood donors recruited in the same hospital where patients were ascertained. The inclusion criteria were being native-Brazilian of European descent and having age 18 years or older. The control sample was matched to the ADHD patients regarding age, sex, educational level (years of formal schooling), socioeconomic status and marriage status. The exclusion criteria for controls were the same used for the patients (as mentioned above) added to the fulfillment of DSM-IV ADHD diagnosis (American Psychiatric Association, 1994).

The population from Southern Brazil, where this study was performed, is mainly of European descent (Salzano and Bortolini, 2002), and no significant population structure was found in the European derived population of Rio Grande do Sul (Zembrzuski et al., 2006). The interethnic admixture estimates show that individuals from southern Brazil present an almost

exclusively European ancestry (94%) (Santos et al., 2010), making population stratification unlikely to occur in this situation (Hutchison et al., 2004).

All subjects (patients and controls) signed an informed consent approved by the Ethics Committee of the HCPA.

### *Diagnostic procedures*

The same protocol was applied to patients and controls. The presence of ADHD and comorbidities diagnoses were evaluated through the following semi-structured interviews: (a) K-SADS-E (Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children-Epidemiologic Version), adapted to adults, for ADHD and ODD (Mercadante et al., 1995; Grevet et al., 2005); (b) SCID-IV-R (Structured Clinical Interview for DSM-IV) for the Axis I psychiatric comorbidities (First et al., 1998), and (c) M.I.N.I (Mini-international Psychiatric Interview) for the diagnoses of conduct and antisocial personality disorder (Sheehan et al., 1998). The estimated IQ scores were obtained from the vocabulary and block design subtests of the Wechsler Adult Intelligence Scale - Revised (WAIS-R) (Wechsler, 1981) administrated by a trained psychologist. The severity of current ADHD and ODD symptoms was assessed by the Portuguese version of the Swanson, Nolan and Pelham Rating Scale-version IV (SNAP-IV) (Swanson, 1992). Temperament dimensions (novelty seeking, harm avoidance, reward dependence and persistence) were evaluated using the temperament and character inventory (TCI) (Cloninger et al., 1993; 1994). A more detailed description of the ascertainment

methods and psychiatric profile of the ADHD sample is described elsewhere (Grevet et al. 2006; Fischer et al. 2007; Kalil et al. 2008; Karam et al. 2009).

### *Laboratory methods*

The DNA was extracted from peripheral blood according to the salting out procedure (Lahiri and Nurnberger, 1991) and standardized (1:10). The SNP rs5522 in the MR gene was genotyped applying the TaqMan technology on an ABI7500 system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with the following assay-ID: C\_12007869\_20. The standard PCR reaction was carried out using TaqMan Genotyping PCR Master Mix reagent kit according to the manufacturer's instructions. Reference sequences and SNP rs-number were obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### *Statistical analysis*

The genotype and allele frequency comparisons between ADHD patients and controls were performed with the Chi-square test. The association with the presence of comorbidities with considerable frequency in our sample (major depressive disorder, bipolar disorder, generalized anxiety disorder, obsessive-compulsive disorder, anti-social personality disorder, nicotine dependence, alcohol dependence and drug dependence) was also tested by chi-square.

Continuous variables (SNAP and TCI scores) were analyzed by ANOVA. All analyses were carried out in the PASW v.18.0 statistical package software.

The Bonferroni procedure was applied considering the pattern of correlations between the variables included in the study, since independence between variables is an assumption for such corrections. The variance in the “outcome” variables could be ascribed to five main factors: (a) ADHD case-control; (b) presence of internalizing comorbidities (major depressive disorder, generalized anxiety disorder and obsessive-compulsive disorder); (c) presence of externalizing comorbidities (bipolar disorder, antisocial personality disorder and substance use disorders); (d) SNAP-IV scores and (e) temperament. Therefore, the number of independent comparisons to correct for was 5 and the p value set at 0.01.

## RESULTS

Genotype and allele frequencies of the MRI180V polymorphism in ADHD patients and controls are presented in Table 1. Both samples are in Hardy–Weinberg equilibrium (patients:  $\chi^2=0.13$ ;  $P=0.93$ ; control subjects:  $\chi^2=0.06$ ;  $P=0.96$ ). The frequencies of the MRI180V genotypes ( $\chi^2 = 2.71$ ;  $P = 0.26$ ) and alleles ( $\chi^2 = 2,45$ ;  $P = 0,11$ ) among patients and controls did not differ. The Val allele frequency in our control sample (12.1%) was similar to those reported in other European derived control groups, varying from 12% (de Rijk et al., 2006) to 14% (Kuningas et al., 2007). Because of the low allele frequency of the homozygote Val/Val genotype (0.8%), the heterozygous Iso/Val and homozygous Val/Val genotypes were combined for testing association with SNAP and TCI (Table 2) scores and with the presence of comorbidities (Table 3). There were no significant genotypes differences in any phenotype beyond the established 0.01 significance level. However, suggestive evidences with borderline

associations for higher severity of inattention and hyperactivity/impulsivity were observed (Table 2) for adult ADHD patients carrying the Val allele of the MRI180V polymorphism compared to ADHD patients non-carriers.

## **DISCUSSION**

This is as far as we know the first association study between the NR3C2 gene and ADHD. The MRI180V polymorphism was not associated with ADHD, but carriers of the Val allele presented slightly higher inattention and hyperactivity/impulsivity scores.

We hypothesized that the MRI180V could be involved in ADHD predisposition, because it has been suggested that ADHD subjects have an impaired response to stress (King et al., 1998; Ma et al., 2011). Moreover, due to the findings of Kuningas and colleagues (2007), we hypothesized that ADHD adult carrying the Val allele of the MRI180V might present an improper cortisol-inducing response to stress. The borderline, suggestive association between inattention and hyperactivity/impulsivity scores and ADHD carriers of the Val allele might be consistent with the findings of Otte and colleagues (2007) in which blockade of MR impaired several aspects of cognition, such as selective attention. As well as Val allele carriers cells showed loss of function using cortisol as ligand in *in vitro* studies (Arai et al., 2003; de Rijk et al., 2006), ADHD subjects with the homozygote Val/Val or with the heterozygote Iso/Val genotypes might have a lower cortisol-induced MR gene expression and consequent greater impairment in attention tasks than non-carriers.

The modulation of the stress response as well as of the HPA axis, not only in ADHD, but also in the healthy population, is influenced by many genetic and environmental factors (El Hage et al., 2009; Gillespie et al., 2009). For example, the cortisol level is influenced –



among other factors - by variation in other genes, such as the polymorphism MR-2G/C (Muhtz et al., 2010) and polymorphisms in the GR gene (de Rijk, 2009).

Our borderline association findings with ADHD severity should be viewed with caution, considering both the small effect in SNAP-IV scores, and the fact that several variables that were tested (personality and comorbid psychiatric disorders) were not associated. In addition, previous GWAS findings in ADHD have not detected a signal in the NR3C2 region. On the other hand, this finding might justify a more detailed analysis in this genome region, considering the potential relevance of this candidate gene, which probably demands more attention. Interestingly, this genome region has been identified as relevant in other GWAS studies, such as for intelligence (Pan et al., 2011) and tobacco use (Berrettini et al., 2008). Single gene association studies are frequently viewed with skepticism, since they are potentially prone to the selective publication of positive findings, which are frequently not replicated afterwards. Our publications are extremely cautious in this respect and focused on a small number of genes and polymorphisms. The focus is on candidate genes for which there are positive findings in meta-analysis, and in this case we publish both positive and negative findings (Grevet et al., 2007; de Cerqueira et al., 2010), including response to treatment (Contini et al., 2010a,b) in this Brazilian sample. Therefore, the decision to study the NR3C2 gene is an exception to this rule, motivated by the wish to study for the first time specifically this gene which codifies the main receptor involved in the initial triggering of stress response (de Rijk et al. 2006).

Taken together, findings presented are preliminary and provide only suggestive evidence for a possible role of NR3C2 in ADHD severity. A more detailed analysis of the gene, including other polymorphisms is also necessary.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

Funding for this study was provided by the following Brazilian funding agencies: CNPq – Institutos do Milênio, CAPES, FAPERGS and PRONEX.

## **POTENTIAL CONFLICT OF INTERESTS**

Dr Rohde was on the speaker's bureau and/or acted as consultant for Eli-Lilly, Janssen-Cilag, and Novartis in the last three years. Currently, his only industry related activity is taking part in the advisory board/speaker's bureau for Eli-Lilly and Novartis (less than US\$ 10,000 per year and reflecting less than 5% of his gross income per year). The ADHD Program chaired by him received unrestricted educational and research support from the following pharmaceutical companies in the last three years: Abbott, Bristol-Myers Squibb, Eli-Lilly, Janssen-Cilag, and Novartis. Dr Belmonte-de-Abreu is on the speaker's bureau or is a consultant for Janssen-Cilag and Bristol-Myers Squibb. Dr Grevet is on the speaker's bureau or is a consultant for Novartis, Janssen-Cilag and Shire.

## REFERENCES

- American Psychiatric Association (1994) Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 4th edn. American Psychiatric Press, Washington, DC
- Arai K, Nakagomi Y, Iketani M et al (2003) Functional polymorphisms in the mineralocorticoid receptor and amiloride-sensitive sodium channel genes in a patient with sporadic pseudohypoaldosteronism. *Hum Genet* 112:91-97.
- Berrettini W, Yuan X, Tozzi F et al (2008) Alpha-5/alpha-3 nicotinic receptor subunit alleles increase risk for heavy smoking. *Mol psychiatry* 13:368-373.
- Blomqvist M, Holmberg K, Lindblad F et al (2007) Salivary cortisol levels and dental anxiety in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Eur J Oral Sci* 115:1-6.
- Bogdan R, Perlis RH, Fagerness J et al (2010) The impact of mineralocorticoid receptor ISO/VAL genotype (rs5522) and stress on reward learning. *Genes Brain Behav* 9:658-667.
- Cloninger CR, Svrakic DM, Przybeck TR (1993) A psychobiological model of temperament and character. *Arch Gen Psychiatry* 50:975-990.
- Cloninger CR, Przybeck TR, Svrakic DM (1994) The temperament and character inventory (TCI) A guide to its development and use. Center for Psychobiology of Personality, Washington University, St. Louis, Missouri.
- Contini V, Victor MM, Cerqueira CC et al (2010a) Adrenergic alpha2A receptor gene is not associated with methylphenidate response in adults with ADHD. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* [Epub ahead of print]

- Contini V, Victor MM, Marques FZ et al (2010b) Response to methylphenidate is not influenced by DAT1 polymorphisms in a sample of Brazilian adult patients with ADHD. *J Neural Transm* 117(2):269-276
- de Cerqueira CC, Polina ER, Contini V et al (2010) ADRA2A polymorphisms and ADHD in adults: Possible mediating effect of personality. *Psychiatry Res* [Epub ahead of print]
- de Kloet ER (2003) Hormones, brain and stress. *Endocr Regul* 37(2):51-68
- de Kloet ER, Joels M, Holsboer F (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6:463-475
- de Kloet ER, Van Acker SA, Sibug RM et al (2000) Brain mineralocorticoid receptors and centrally regulated functions. *Kidney Int* 57:1329-1336
- de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS et al (1998) Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 19(3):269-301
- de Rijk RH (2009) Single nucleotide polymorphisms related to HPA axis reactivity. *Neuroimmunomodulation* 16:340-352
- de Rijk RH, de Kloet ER, Zitman FG et al (2011) Mineralocorticoid receptor gene variants as determinants of HPA axis regulation and behavior. *Endocr Dev* 20:137-148
- de Rijk RH, van Leeuwen N, Klok MD et al (2008) Corticosteroid receptor-gene variants: modulators of the stress-response and implications for mental health. *Eur J Pharmacol* 585:492-501
- de Rijk RH, Wust S, Meijer OC et al (2006) A common polymorphism in the mineralocorticoid receptor modulates stress responsiveness. *J Clin Endocrinol Metab* 91:5083-5089
- Deshauer D, Duffy A, Alda M et al (2003) The cortisol awakening response in bipolar illness: a pilot study. *Can J Psychiatry* 48(7):462-466

- El Hage W, Powell JF, Surguladze SA (2009) Vulnerability to depression: What is the role of stress genes in gene x environment interaction? *Psychol med* 39:1407-1411.
- Faraone SV, Biederman J, Mick E (2006) The age-dependent decline of attention deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis of follow-up studies. *Psychol Med* 36:159-165
- Fayyad J, de Graaf R, Kessler R et al (2007) Cross-national prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder. *Br J Psychiatry* 190:402-409
- First MB, Spitzer RL, Gibbon M et al (1998) Structured Clinical Interview for DSMIV (SCID-I). Biomedics Research Department, New York
- Fischer AG, Bau CH, Grevet EH et al (2007) The role of comorbid major depressive disorder in the clinical presentation of adult ADHD. *J Psychiatr Res* 41:991-996
- Funder JW (2004) Aldosterone, mineralocorticoid receptors and vascular inflammation. *Mol Cell Endocrinol* 217:263-269
- Gillespie CF, Phifer J, Bradley B et al (2009) Risk and resilience: genetic and environmental influences on development of the stress response. *Depress Anxiety* 26(11):984-992
- Grevet EH, Bau CH, Salgado CA et al (2005) [Interrater reliability for diagnosis in adults of attention deficit hyperactivity disorder and oppositional defiant disorder using K-SADS-E]. *Arq Neuropsiquiatr* 63(2A): 307-310.
- Grevet EH, Bau CH, Salgado CA 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
- Grevet EH, Marques FZ, Salgado CA et al (2007) Serotonin transporter gene polymorphism and the phenotypic heterogeneity of adult ADHD. *J Neural Transm* 114(12):1631-1636

- Hastings PD, Fortier I, Utendale WT et al (2009) Adrenocortical functioning in boys with attention-deficit/hyperactivity disorder: examining subtypes of ADHD and associated comorbid conditions. *J Abnorm Child Psychol* 37(4):565-578
- Holsboer F (2001) Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *J Affect Disord* 62:77-91
- Hutchison KE, Stallings M, McGueary J et al (2004) Population stratification in the candidate gene study: fatal threat or red herring? *Psychol Bull* 130:66-79
- Kalil KL, Bau CH, Grevet EH et al (2008) Smoking is associated with lower performance in WAIS-R Block Design scores in adults with ADHD. *Nicotine Tob Res* 10:683-688
- Kaplan E, Fein D, Morris R et al (1991) WAIS-R: manual. Psychological corporation, San Antonio
- Karam RG, Bau CH, Salgado CA et al. (2009) Late-onset ADHD in adults: milder, but still dysfunctional. *J Psychiatr Res* 43:697-701
- King JA, Barkley RA, Barrett S (1998) Attention-deficit hyperactivity disorder and the stress response. *Biol Psychiatry* 44:72-74
- Kuningas M, de Rijk RH, Westendorp RG et al (2007) Mental performance in old age dependent on cortisol and genetic variance in the mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *Neuropsychopharmacology* 32:1295-1301
- Lackschewitz H, Huther G, Kroner-Herwig B (2008) Physiological and psychological stress responses in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Psychoneuroendocrinology* 33:612-624
- Lahiri DK, Nurnberger Jr JI (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19(19):5444

- Lovallo WR, Thomas TL (2000) Stress hormones in psychophysiological research. In: Cacioppo JT, Tassinary LG and Berntson GG (eds.) Handbook of psychophysiology 2nd edn. Cambridge University Press, New York, pp 342–367
- Ma L, Chen YH, Chen H et al (2011) The function of hypothalamus-pituitary-adrenal axis in children with ADHD. *Brain Res* 1368:159-162
- Mercadante MT, Asbahar F, Rosário MC et al (1995) K-SADS, entrevista semi-estruturada para diagnóstico em psiquiatria da infância, versão epidemiológica. FMUSP, São Paulo
- Muhtz C, Zyriax BC, Bondy B et al (2010) Association of a common mineralocorticoid receptor gene polymorphism with salivary cortisol in healthy adults. *Psychoneuroendocrinology* 36(2):298-301.
- Otte C, Moritz S, Yassouridis A et al (2007) Blockade of the mineralocorticoid receptor in healthy men: effects on experimentally induced panic symptoms, stress hormones, and cognition. *Neuropsychopharmacology* 32:232-238
- Pan Y, Wang KS, Aragam N (2011) Ntm and nr3c2 polymorphisms influencing intelligence: Family-based association studies. *Prog neuropsychopharmacol biol psychiatry* 35:154-160
- Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL et al (2007) The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry* 164:942-948
- Reul JM, de Kloet ER (1985) Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117(6):2505-2511
- Rybakowski JK, Twardowska K (1999) The dexamethasone/corticotropin-releasing hormone test in depression in bipolar and unipolar affective illness. *J Psychiatr Res* 33:363-370
- Salzano FM, Bortolini MC (2002) The evolution and genetics of Latin American populations. Cambridge University Press, Cambridge.

- Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK et al (2010) Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (insel) ancestry-informative marker (aim) panel. *Hum Mutat* 31:184-190.
- Sheehan DV, Lecrubier Y, Sheehan KH et al (1998) The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): the development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10. *J Clin Psychiatry* 59 Suppl 20: 22-33; quiz 34-57.
- Simon V, Czobor P, Balint S et al (2009) Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis. *Br J Psychiatry* 194:204-211
- Swanson JM (1992) School-based assessments and interventions for ADD students. KC Publishing, Irvine
- van West D, Claes S, Deboutte D (2009) Differences in hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning among children with ADHD predominantly inattentive and combined types. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 18(9):543-553
- Wechsler D (1981) WAIS-R – Manual for the Wechsler Adult Intelligence Scale – Revised. The Psychological Corporation. San Antonio, Texas
- Zembrzuski VM, Callegari-Jacques SM, Hutz MH (2006) Application of an African Ancestry Index as a genomic control approach in a Brazilian population. *Ann Hum Genet* 70:822-828



Table 1. *Genotype and allele frequencies of the MRI180V polymorphism in adult ADHD subjects and controls*

	ADHD (n = 478)		Controls (n = 597)		Analysis	
	Mean	(±SD)	Mean	(±SD)	$\chi^2$	<i>P</i>
MRI180V genotype	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%		
Iso/Iso	388	81.2	461	77.2	2.71	0.26
Iso/Val	86	18.0	128	21.5		
Val/Val	4	0.8	8	1.3		
Allele frequencies	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%		
Iso	862	90.2	1050	87.9	2.45	0.11
Val	94	9.8	144	12.1		

ADHD – attention-deficit/hyperactivity disorder

<sup>1</sup> Continuity correction was applied for the tests.

<sup>2</sup> The number of missing values may differ for each analysis

Table 2. Severity and temperament measures and the presence of Val allele of the MRI180V polymorphism in adult ADHD subjects

	Val allele carriers (n = 83, 18.6%) Mean ( $\pm$ SD)	Non-carriers (n = 362, 81.4%) Mean ( $\pm$ SD)	$F^1$	$P$
<b>Snap scores</b>				
Inattention	1.96 (0.57)	1.82 (0.54)	5.50	0.02
Hyperactivity/Impulsivity	1.68 (0.71)	1.47 (0.72)	6.47	0.01
Oppositional defiant disorder	0.96 (0.61)	0.92 (0.58)	0.34	0.56
Total	1.55 (0.50)	1.42 (0.48)	5.29	0.02
<b>TCI dimensions</b>				
Novelty seeking	24.00 (6.21)	24.34 (6.26)	0.22	0.63
Harm avoidance	20.47 (7.47)	19.76 (6.78)	0.81	0.36
Reward dependence	15.84 (10.82)	15.10 (6.53)	0.71	0.39
Persistence	4.56 (1.83)	4.19 (1.89)	2.57	0.10

<sup>1</sup>ANOVA - Sex and age were included as covariates in all analyses.

Table 3. Presence of lifetime comorbidities and the presence of Val allele of the MRR180V polymorphism in adult ADHD subjects<sup>1</sup>

Comorbidities	Val allele carriers		Non-carriers		$\chi^2$	P <sup>2</sup>
	n	%	n	%		
Major depressive disorder						
Yes (n = 169)	32	18.9	137	81.1		0.98
No (n = 272)	50	18.4	222	81.6		
Bipolar disorder						
Yes (n = 81)	18	22.2	63	77.8	0.59	0.44
No (n = 360)	64	17.8	296	82.2		
Generalized anxiety disorder,						
Yes (n = 89)	22	24.7	67	75.3	2.24	0.13
No (n = 351)	60	17.1	291	82.9		
Obsessive-compulsive disorder						
Yes (n = 27)	6	22.2	21	77.8	0.05	0.81
No (n = 413)	76	18.4	337	81.6		
Antisocial personality disorder						
Yes (n = 34)	5	14.7	29	85.3	0.16	0.68
No (n = 407)	78	19.2	329	80.8		
Nicotine dependence						
Yes (n = 194)	31	37.3	163	45.4	1.46	0.22
No (n = 248)	52	62.7	196	54.6		
Alcohol dependence						
Yes (n = 38)	5	13.2	33	86.8	0.46	0.49
No (n = 403)	77	19.1	326	80.9		
Drug dependence						
Yes (n = 42)	7	16.7	35	83.3	0.01	0.89
No (n = 399)	75	18.8	324	81.2		

<sup>1</sup> Continuity correction was applied for the tests.

<sup>2</sup> The number of missing values may differ for each analysis

## **Capítulo 4**

### **Discussão**

Os aspectos mais específicos referentes aos resultados obtidos nesta dissertação foram discutidos no artigo científico (capítulo 3). No presente capítulo serão mencionados alguns aspectos mais gerais deste trabalho que não puderam ser incluídos nos artigos.

Nossa hipótese inicial era de que o polimorfismo MRI180V estaria associado ao TDAH, devido às evidências de que o eixo HPA de pacientes com TDAH desempenharia uma resposta inadequada a eventos de estresse (Lackschewitz e cols., 2008; van West e cols., 2009; Ma e cols., 2011). Tendo em vista que o MRI180V está envolvido ativamente na regulação do eixo HPA (de Rijk e cols., 2006), polimorfismos neste gene são claros candidatos ao desencadeamento do TDAH. Nossos resultados, entretanto, não corroboram a hipótese inicial. Não há diferenças estatisticamente significativas no que se refere à associação caso-controle. Por outro lado, houve uma associação significativa, porém fraca, entre medidas de desatenção e de hiperatividade/impulsividade com adultos com TDAH portadores do alelo Val em relação a adultos com TDAH não portadores.

Estamos cientes de que a variabilidade da resposta ao estresse é multifatorial (El Hage e cols., 2009; Gillespie e cols., 2009). Dessa forma, existem outros polimorfismos nos genes, como os presentes nos receptores GR e MR (de Rijk, 2009), que também podem influenciar este transtorno e a própria manutenção do eixo HPA (de Rijk e cols., 2011) que necessitam ser estudados em conjunto com o MRI180V em amostras de pacientes TDAH. Além disso, um dos genes mais estudados quanto à suscetibilidade ao estresse, depressão e traços da personalidade envolvidos com ansiedade é o gene do transportador da serotonina (5-HTT) (Anguelova e cols., 2003; Kuzelova e cols., 2010). Dentre as associações positivas entre genes candidatos ao TDAH descritas na meta-análise de Gizer e cols. (2009) (Ver em Capítulo 1), encontra-se esse gene. Um polimorfismo de deleção/inserção (5-HTTLPR) mostrou-se

funcional (Nakamura e cols., 2000). Em um estudo prévio envolvendo uma parcela da presente amostra de adultos foi verificada associação entre o alelo S do 5-HTTLPR e maiores escores de desatenção, procura por novidades e dependência a drogas (Grevet e cols., 2007). Diante da importância que o 5-HTTLPR tem dentro da vulnerabilidade ao estresse, depressão e ansiedade, o nosso grupo continua estudando mais detalhadamente esse gene, porém ainda não há dados suficientes para a inclusão nessa dissertação. Uma perspectiva é a análise envolvendo possíveis interações entre polimorfismos dos dois genes. Além disso, uma possibilidade interessante é o estudo de possíveis interações com variações genéticas nos genes alvo dos receptores esteróides.

Estudos de associação que envolvem um único gene precisam ser vistos com cautela, uma vez que são potencialmente sujeitos à publicação seletiva dos achados positivos, muitos dos quais não são replicados posteriormente. Os trabalhos do nosso grupo buscam publicar tanto os resultados positivos, quanto negativos, evitando assim esse risco. A decisão de estudar pela primeira vez o NR3C2 partiu de uma hipótese motivada especificamente porque este gene codifica o principal receptor envolvido no desencadeamento inicial da resposta ao estresse (de Rijk e cols., 2006). Tendo em conta esse resultado instigante, estamos buscando parcerias científicas para replicar esse achado em outras amostras de adultos com TDAH. A confirmação do papel desse gene só virá idealmente quando, além da eventual replicação dos dados, tivermos um número de estudos suficiente para a realização de uma meta-análise com resultado positivo. Vale destacar que estudos de varredura genômica identificaram a região genômica do gene NR3C2 como relevante para a inteligência (Pan e cols., 2011) e para a gravidade do tabagismo (Berrettini e cols., 2008), o que reforça a importância do estudo desse gene dentro dos transtornos psiquiátricos e variáveis relacionadas.

Portanto, os resultados preliminares apresentados fornecem evidências sugestivas de um papel do gene NR3C2 na gravidade do TDAH. Eles sugerem que esse gene merece mais estudos, incluindo outros polimorfismos e em amostras maiores.

## **Capítulo 5**

### **Referências Bibliográficas da Introdução e da Discussão**



- Adler LA (2008) Epidemiology, impairments, and differential diagnosis in adult ADHD: introduction. *CNS Spectr* 13:4-5.
- Albayrak O, Friedel S, Schimmelmann BG, Hinney A e Hebebrand J (2008) Genetic aspects in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Neural Transm* 115:305-315.
- American Psychiatric Association (1994) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition*. American Psychiatric Association. Washington.
- Anguelova M, Benkelfat C e Turecki G (2003) A systematic review of association studies investigating genes coding for serotonin receptors and the serotonin transporter: I. Affective disorders. *Mol Psychiatry* 7:574–591.
- Arai K, Nakagomi Y, Iketani M, Shimura Y, Amemiya S, Ohyama K e Shibasaki T (2003) Functional polymorphisms in the mineralocorticoid receptor and amiloride-sensitive sodium channel genes in a patient with sporadic pseudohypoaldosteronism. *Hum Genet* 112:91–97.
- Arnold L (1996) Sex differences in ADHD: conference summary. *J Abnorm Child Psychol* 24: 555-569.
- Berger S, Wolfer DP, Selbach O, Alter H, Erdmann G, Reichardt HM, Chepkova AN, Welzl H, Haas HL, Lipp HP, *e cols.* (2006) Loss of the limbic mineralocorticoid receptor impairs behavioral plasticity. *Proc Natl Acad Sci* 103:195–200.
- Berrettini W, Yuan X, Tozzi F, Song K, Francks C, Chilcoat H, Waterworth D, Muglia P e Mooser V (2008) Alpha-5/alpha-3 nicotinic receptor subunit alleles increase risk for heavy smoking. *Mol psychiatry* 13:368-373.

- Bhatara V, Loudenberg R e Ellis R (2006) Association of attention deficit hyperactivity disorder and gestational alcohol exposure: an exploratory study. *J Atten Disord* 9:515-522.
- Biederman J, Milberger S, Faraone SV, Kiely K, Guite J, Mick E, Ablon S, Warburton R e Reed E (1995) Family-environment risk factors for attention deficit hyperactivity disorder: A test of Rutter's indicators of adversity. *Arch Gen Psychiatry* 52:464-470.
- Biederman J, Wilens T, Mick E, Faraone SV, Weber W, Curtis S, Thornell A, Pfister K, Jetton JG, Soriano J (1997) Is ADHD a risk factor for psychoactive substance use disorders? Findings from a four-year prospective follow-up study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 36:21-29.
- Biederman J (1998) Attention-deficit/hyperactivity disorder: a life-span perspective. *J Clin Psychiatry* 59:4-16.
- Biederman J (2005) Attention-deficit/hyperactivity disorder: a selective overview. *Biol Psychiatry* 57:1215-1220.
- Bogdan R, Perlis RH, Fagerness J e Pizzagalli DA (2010) The impact of mineralocorticoid receptor ISO/VAL genotype (rs5522) and stress on reward learning. *Genes Brain Behav* 9:658-667.
- Button TM, Thapar A e McGuffin P (2005) Relationship between antisocial behaviour, attention-deficit hyperactivity disorder and maternal prenatal smoking. *Br J Psychiatry* 187:155-160.
- Cloninger CR, Svrakic DM e Przybeck TR (1993) A psychobiological model of temperament and character. *Arch Gen Psychiatry* 50:975-990.
- Conrad CD, Lupien SJ, Thanasoulis LC e McEwen BS (1997) The effects of type I and type II corticosteroid receptor agonists on exploratory behavior and spatial memory in the Y-maze. *Brain Res* 759:76-83.

- Crystal DS, Ostrander R, Chen RS e August GJ (2001) Multimethod assessment of psychopathology among DSM-IV subtypes of children with attention-deficit/hyperactivity disorder: self-, parent, and teacher reports. *J Abnorm Child Psychol* 29:189-205.
- de Kloet ER (2003) Hormones, brain and stress. *Endocr Regul* 37:51-68 .
- de Kloet ER, de Rijk RH e Meijer OC (2007) Therapy insight: is there an imbalanced response of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in depression? *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3:168–179.
- de Kloet ER, Joëls M e Holsboer F (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6:463–475.
- de Rijk RH (2009) Single nucleotide polymorphisms related to HPA axis reactivity. *Neuroimmunomodulation* 16:340-352.
- de Rijk RH, de Kloet ER, Zitman FG e van Leeuwen N (2011) Mineralocorticoid receptor gene variants as determinants of HPA axis regulation and behavior. *Endocr Dev* 20:137-148.
- de Rijk RH, Wust S, Meijer OC, Zennaro MC, Federenko IS, Hellhammer DH, Giacchetti G, Vreugdenhil E, Zitman FG e de Kloet ER (2006) A common polymorphism in the mineralocorticoid receptor modulates stress responsiveness. *J Clin Endocrinol Metab* 91:5083-5089.
- de Rijk RH, van Leeuwen N, Klok MD e Zitman FG (2008) Corticosteroid receptor-gene variants: modulators of the stress-response and implications for mental health. *Eur J Pharmacol* 585:492-501.
- de Rijk RH, Wüst S, Meijer OC, Zennaro M-C, Federenko IS, Hellhammer DH, Giacchetti G, Vreugdenhil E, Zitman FG e de Kloet ER (2006) A common polymorphism in the

- mineralocorticoid receptor modulates stress responsiveness. *J Clin Endocrinol Metab* 91:5083–5089.
- Douma BR, Korte SM, Buwalda B, la Fleur SE, Bohus B e Luiten PG (1998) Repeated blockade of mineralocorticoid receptors, but not of glucocorticoid receptors impairs food rewarded spatial learning. *Psychoneuroendocrinology* 23:33–44.
- El Hage W, Powell JF e Surguladze SA (2009) Vulnerability to depression: What is the role of stress genes in gene x environment interaction? *Psychol med* 39:1407-1411.
- Faraone SV, Biederman J, Weber W, Russell RL (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 and Adolesc Psychiatry* 37:185-193.
- Faraone SV e Khan AS (2006) Candidate gene studies of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychiatry* 8:13-20.
- Faraone SV, Biederman J e Mick E (2006) The age-dependent decline of attention deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis of follow-up studies. *Psychol Med* 36:159-165.
- Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE, Smoller JW, Goralnick JJ, Holmgren MA e Sklar P (2005) Molecular Genetics of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Biol Psychiatry* 57:1313-1323.
- Faraone SV, Sergeant J, Gillberg C e Biederman J (2003) The worldwide prevalence of ADHD: is it an American condition? *World Psychiatry* 2:104-113.
- Fayyad J, De Graaf R, Kessler R, Alonso J, Angermeyer M, Demyttenaere K, De Girolamo G, Haro JM, Karam EG, Lara C, *e cols.* (2007) Cross-national prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder. *Br J Psychiatry* 190:402-409.

- Franke B, Neale BM e Faraone SV (2009) Genome-wide association studies in ADHD. *Hum Genet* 126:13-50.
- Gillespie CF, Phifer J, Bradley B e Ressler KJ (2009) Risk and resilience: genetic and environmental influences on development of the stress response. *Depress Anxiety* 26:984-992.
- Gittelman R, Mannuzza S, Shenker R, Bonagura N (1985) Hyperactive boys almost grown up: I Psychiatric status. *Arch Gen Psychiatry* 42:937-994.
- Gizer IR, Ficks C e Waldman ID (2009) Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet* 126:51-90.
- Grevet EH, Bau CH, Salgado CA, Fischer A, Kalil K, Victor MM, Garcia C, Sousa NO e Belmonte-de-Abreu P (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* 256:311-319.
- Grevet EH, Bau CHD, Salgado CAI, Fischer A, Victor MM, Garcia C, de Sousa NO, Nerung L e Belmonte-de-Abreu P (2005) Interrater reliability for diagnosis in adults of attention deficit hyperactivity disorder and oppositional defiant disorder using K-SADS-E. *Arq Neuropsiquiatr* 63:307-310.
- Grevet EH, Marques FZ, Salgado CA, Fischer AG, Kalil KL, Victor MM, Garcia CR, Sousa NO, Belmonte-de-Abreu P e Bau CH (2007) Serotonin transporter gene polymorphism and the phenotypic heterogeneity of adult ADHD. *J Neural Transm* 114:1631-1636.
- Gunzerath L e Goldman D (2003) G x E: a NIAAA workshop on gene-environment interactions. *Alcohol Clin Exp Res* 27:540-562.

- Haller J, Mikics E e Makara GB (2008) The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily functions and the central neural system. A critical evaluation of findings. *Front Neuroendocrinol* 29:273–291.
- Jensen P, Martin D e Cantwell D (1997) Comorbidity in ADHD: implications for research, practice and DSM-IV. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 36:1065-1079.
- Kariyawasam SH, Zaw F e Handley SL (2002) Reduced salivary cortisol in children with comorbid Attention deficit hyperactivity disorder and oppositional defiant disorder. *Neuro Endocrinol Lett* 23:45-48.
- Kendler KS, Heath AC, Martin NG e Eaves LJ (1987) Symptoms of anxiety and symptoms of depression. Same genes, different environments? *Arch Gen Psychiatry* 44:451-457.
- Kessler RC, Adler L, Barkley R, Biederman J, Conners CK, Demler O, Faraone SV, Greenhill LL, Howes MJ, Secnik K, *e cols.* (2006) The prevalence and correlates of adult ADHD in the United States: results from the National Comorbidity Survey Replication. *Am J Psychiatry* 163:716-723.
- King JA, Barkley RA e Barrett S (1998) Attention-deficit hyperactivity disorder and the stress response. *Biol Psychiatry* 44:72-74.
- Lackschewitz H, Huther G e Kroner-Herwig B (2008) Physiological and psychological stress responses in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Psychoneuroendocrinology* 33:612-624.
- Lasky-Su J, Neale BM, Franke B, Anney RJ, Zhou K, Maller JB, Arias-Vasquez A, Chen W, Asherson P, Buitelaar J, *e cols.* (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:1345–1354.

- Lesch KP, Timmesfeld N, Renner TJ, Halperin R, Roser C, Nguyen TT, Craig DW, Romanos J, Heine M, Meyer J, *e cols.* (2008) Molecular genetics of adult ADHD: converging evidence from genome-wide association and extended pedigree linkage studies. *J Neural Transm* 115:1573– 1585.
- Ma L, Chen YH, Chen H, Liu YY e Wang YX (2011) The function of hypothalamus-pituitary-adrenal axis in children with ADHD. *Brain Res* 1368:159-162.
- Marquez C, Nadal R e Armario A (2006) Influence of reactivity to novelty and anxiety on hypothalamic-pituitary-adrenal and prolactin responses to two different novel environments in adult male rats. *Behav Brain Res* 168:13-22.
- Mick E, Todorov A, Smalley S, Hu X, Loo S, Todd RD, Biederman J, Byrne D, Dechairo B, Guiney A, *e cols.* (2010) Family-based genome-wide association scan of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 49:898-905.
- Millstein RB, Wilens TE, Biederman J e Spencer TJ (1997) Presenting ADHD symptoms and subtypes in clinically referred adults with ADHD. *J Attention Disord* 2:159-166.
- Murphy K, Barkley RA (1996) Attention deficit hyperactivity disorder adults: comorbidities and adaptive impairments. *Comp Psychiatry* 37:393-401.
- Murphy KR, Barkley RA e Bush T (2002) Young adults with attention deficit hyperactivity disorder: subtype differences in comorbidity, educational, and clinical history. *J Nerv Ment Dis* 190:147-157.
- Nakamura M, Ueno S, Sano A e Tanabe H (2000) The human serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) shows ten novel allelic variants. *Mol Psychiatry* 5:32–38.

- Neale BM, Lasky-Su J, Anney R, Franke B, Zhou K, Maller JB, Arias-Vasquez A, Asherson P, Chen W, Banaschewski T, *e cols.* (2008) Genome-wide association scan of attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B:1337–1344.
- Neale BM, Medland S, Ripke S, Anney RJ, Asherson P, Buitelaar J, Franke B, Gill M, Kent L, Holmans P, *e cols.* (2010) Case-control genome-wide association study of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 49:906-920.
- Noorlande CW, de Graan PN, Middeldorp J, van Beers JJ e Visser GH (2006) Ontogeny of hippocampal corticosteroid receptors: effects of antenatal glucocorticoids in human and mouse. *J Comp Neurol* 499:924–932.
- Oitzl MS e de Kloet ER (1992) Selective corticosteroid antagonists modulate specific aspects of spatial orientation learning. *Behav Neurosci* 106:62–71.
- Otte C, Moritz S, Yassouridis A, Koop M, Madrischewski AM, Wiedemann K e Kellner M (2007) Blockade of the mineralocorticoid receptor in healthy men: effects on experimentally induced panic symptoms, stress hormones, and cognition. *Neuropsychopharmacology* 32:232-238.
- Pan Y, Wang KS e Aragam N (2011) Ntm and nr3c2 polymorphisms influencing intelligence: Family-based association studies. *Prog neuropsychopharmacol biol psychiatry* 35:154-160.
- Pfiffner LJ, Calzada E e Mc Burnett K (2000) Interventions to enhance social competence. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 9:689-709.
- Polanczyk G, Lima MS, Horta BL, Biederman J e Rohde LA (2007) The Worldwide Prevalence of ADHD: A systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry* 164:942–948.
- Reul JM e de Kloet ER (1985) Two receptor systems for corticosterone in the rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117:2505– 2511.



- Rohde LA e Mattos P (2003) *Princípios E Práticas em TDAH*. Ed. Artmed, Porto Alegre, 85-105 pp.
- Salgado CA, Bau CH, Grevet EH, Fischer AG, Victor MM, Kalil KL, Sousa NO, Garcia CR e Belmonte-de-Abreu P (2009) Inattention and hyperactivity dimensions of ADHD are associated with different personality profiles. *Psychopathology* 42:108-112.
- Sandi C e Rose SP (1994) Corticosteroid receptor antagonists are amnesic for passive avoidance learning in day-old chicks. *Eur J Neurosci* 6:1292–1297.
- Schmidt M, Enthoven L, van der Mark M, Levine S, de Kloet ER e Oitzl MS (2003) The postnatal development of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the mouse. *Int J Neurosci* 21:125–132.
- Simon V, Czobor P, Bálint S, Mészáros A e Bitter I (2009) Prevalence and correlates of adult attention deficit/hyperactivity disorder: meta-analysis. *Br J Psychiatry* 194:204-211.
- Sonuga-Barke EJ, Lasky-Su J, Neale BM, Oades R, Chen W, Franke B, Buitelaar J, Banaschewski T, Ebstein R, Gill M, *e cols.* (2008) Does parental expressed emotion moderate genetic effects in ADHD? An exploration using a genome wide association scan. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B:1359–1368.
- Souza I, Serra MA, Mattos P e Franco VA (2001) Comorbidade em crianças e adolescentes com transtorno do déficit de atenção. *Arq Neuropsiquiatr* 59:401-406.
- Still GF (1902) Some abnormal psychological conditions in children. *Lancet* 1:1008- 1012,1077-1082,1163-1168.
- Swanson JM, Kraemer HC, Hinshaw SP, Arnold LE, Conners CK, Abikoff HB, Clevenger W, Davies M, Elliott GR, Greenhill LL, *e cols.* (2001) Clinical relevance of the primary findings

- of the MTA: success rates based on severity of ADHD and ODD symptoms at the end of treatment. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 40:168-179.
- Talge NM, Neal C e Glover V (2007) Antenatal maternal stress and long-term effects on child neurodevelopment: how and why? *J Child Psychol Psychiatry* 48:245-61.
- Turner-Cobb JM (2005) Psychological and stress hormone correlates in early life: a key to HPA-axis dysregulation and normalisation. *Stress* 8:47-57.
- van West D, Claes S e Deboutte D (2009) Differences in hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning among children with ADHD predominantly inattentive and combined types. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 18:543-553.
- Vegt R, Bertoli-Avella AM, Tulen JH, de Graaf B, Verkerk AJ, Vervoort J, Twigt CM, Maat-Kievit A, van Tuijl R, van der Lijn M, *e cols.* (2009) Genome-wide linkage analysis in a Dutch multigenerational family with attention deficit hyperactivity disorder. *Eur J Hum Genet* (no prelo)
- Weiss G, Hechtman L, Milroy T e Perlman T (1985) Psychiatric status of hyperactives as adults: A controlled prospective 15-year follow-up of 63 hyperactive children. *J Am Acad Child Psychiatry* 24:211-220.
- Wender PH, Wood DR e Reimherr FW (1985) Pharmacological treatment of attention deficit disorder, residual type (ADD, RT, “minimal brain dysfunction”, “hyperactivity”) in adults. *Psychopharmacol Bull* 21:222-231.
- Yau JL, Noble J e Seckl JR (1999) Continuous blockade of brain mineralocorticoid receptors impairs spatial learning in rats. *Neurosci Lett* 277:45-48.

Yau JL, Olsson T, Morris RG, Meaney MJ e Seckl JR (1995) Glucocorticoids, hippocampal corticosteroid receptor gene expression and antidepressant treatment: relationship with spatial learning in young and aged rats. *Neuroscience* 66:571–581.

Zennaro M-C e Lombes M (2004) Mineralocorticoid resistance. *Trends Endocrinol Metab* 15:264–270.

**Capítulo 7**  
**Anexos**

## A. Termo de Consentimento Informado – casos

### TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

#### Informação sobre o Estudo com Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade em Adultos (TDAHA)

Prezado(a) Senhor(a):

Somos um grupo de pesquisadores da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e pretendemos estudar a relação entre **Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade no Adulto** (identificado com a sigla **TDAHA**) e suas características genéticas. Este é um transtorno freqüente em adultos, acometendo cerca de 3 em cada 100 pessoas. O TDAHA tende a prejudicar o rendimento e o progresso da pessoa em diferentes áreas da vida, como trabalho e relacionamento social, mas raramente é visto como transtorno (em geral as pessoas acham que é falta de força de vontade, de caráter, etc.). É um problema que com freqüência também se associa a outros, como uso de drogas e álcool ou alterações cíclicas de humor (altos e baixos, também descritos como Transtorno Bipolar de Humor). Existe uma impressão de que o tipo de maior complicação, que é o com Hiperatividade, tenha bases genéticas diferentes daquele que tem somente Desatenção.

As pessoas selecionadas para o estudo serão submetidas a uma avaliação psiquiátrica que será mantida sob sigilo absoluto. Se houver um diagnóstico psiquiátrico (Síndrome Psiquiátrica) esse será comunicado ao paciente. Esforços serão feitos no sentido de orientá-lo e encaminhá-lo para o tratamento adequado, dentro dos recursos do HCPA e da comunidade. O aconselhamento genético, quando necessário, será oferecido pela equipe sob supervisão do geneticista membro da Equipe Professor Dr. Claiton Henrique Dotto Bau.

Caso o paciente preencha os critérios para o diagnóstico de TDAHA, será coletada 1 (uma) amostra de 10 mililitros (ml) de sangue no Laboratório do HCPA. Esta amostra será utilizada para a separação do material genético nela contido na forma de Ácido Desoxirribonuclêico, conhecido como DNA, ou ADN. A partir deste material extraído, serão estudadas mutações que fazem que seu portador possua um funcionamento mental alterado. O material coletado será guardado no Laboratório de Biologia Molecular do Professor Claiton Bau, no Campus do Vale da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, de uma forma especial sem descrição de nome, e com um número de código com chave de conhecimento exclusivo dos pesquisadores, para estudos posteriores de associação de outros genes como subtipos especiais desta doença. Quaisquer novos estudos serão submetidos previamente à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

Em caso de qualquer dúvida, os pacientes são orientados a entrar em contato com o pesquisador Responsável, Dr. Paulo S. Belmonte de Abreu (fones 3316-8413 e 9191-1644) ou os executores deste trabalho, Dr. Eugênio Horacio Grevet (fone 3333-3734) e Dr. Carlos Alberto Iglesias Salgado (fone 3330-7818). Uma Cópia do Consentimento Informado ficará com o paciente.

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_.

Eu, \_\_\_\_\_ recebi as orientações necessárias para entender o presente estudo, assim como li a Informação do mesmo.

\_\_\_\_\_  
Paciente

\_\_\_\_\_  
Responsável

\_\_\_\_\_  
Pesquisador

## B. Termo de Consentimento Informado – controles

Voluntário n.º

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### Informação sobre o estudo do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade em adultos (TDAH)

Prezado(a) Senhor(a):

Somos um grupo de pesquisadores da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) que estuda o **transtorno de déficit de atenção e hiperatividade no adulto**. Populamente, este transtorno costuma ser chamado de **Déficit de Atenção**. Este é um transtorno freqüente nos adultos, que acomete cerca de 8 milhões de brasileiros. Pessoas com **Déficit de Atenção** apresentam prejuízos no rendimento em diferentes áreas da vida como nos estudos, no trabalho e no convívio familiar e social.

No momento, estamos interessados em estudar pessoas que **NÃO** apresentem **Déficit de Atenção**. Por isso, estamos lhe convidando para participar de uma avaliação psiquiátrica, **como voluntário**, para saber se você apresenta ou não **Déficit de Atenção**.

Se você apresentar o diagnóstico de **Déficit de Atenção**, poderá optar por ser atendido(a) em nosso ambulatório gratuitamente.

Se você **NÃO** apresentar **Déficit de Atenção**, uma entrevista psiquiátrica completa lhe será oferecida para o levantamento de outros problemas psiquiátricos.

Se você apresentar qualquer outro **problema emocional** faremos o esforço possível no sentido de orientá-lo e encaminhá-lo para o tratamento adequado e compatível com sua situação financeira, dentro dos recursos da comunidade.

Esta avaliação será mantida sob absoluto sigilo.

No momento que você estiver doando sangue, será coletada 01 (uma) amostra de 10 mililitros (ml) para nosso estudo. Esta amostra de sangue será utilizada **EXCLUSIVAMENTE** para a avaliação de alguns genes relacionados ao transtorno.

O material extraído e os dados coletados na entrevista serão utilizados para fazer comparações entre pessoas que tem **Déficit de Atenção** e pessoas que não tem o transtorno.

O sangue será guardado no Departamento de Genética da UFRGS aos cuidados do professor Dr. Claiton Henrique Dotto Bau.

Este material será guardado de uma forma especial sem descrição de nome. Apenas com um número de código de conhecimento exclusivo dos pesquisadores.

Se este material vier a ser usado em pesquisas científicas posteriores, você será consultado para saber se aceita ou não que isto seja feito. Quaisquer novos estudos serão submetidos previamente à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas.

Em caso de qualquer dúvida, ou desejo de que seu sangue seja retirado de nosso estudo, você pode entrar em contato pelo telefone com os pesquisadores responsáveis:

Dr. Claiton Henrique Dotto Bau (3308-6718)

Dr. Paulo Belmonte-de-Abreu (3346-2977)

Dr. Eugenio Horacio Grevet (3321-2347 e 9987-7602)

Dr. Eduardo Vitola (3594-1153 e 91056254)

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

Eu, \_\_\_\_\_ recebi as orientações necessárias para entender o presente estudo, assim como li a Informação do mesmo.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

Obs: Uma via deste documento ficará com você e outra com a equipe de pesquisa.

## C. Aprovação da Comissão de Ética – casos



**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:** 01-321

**Versão do Projeto:** 22/01/2002

**Versão do TCLE:** 22/01/2002

**Pesquisadores:**

PAULO SILVA BELMONTE DE ABREU

CLAITON H. O. BAU

EUGENIO GREVET

CARLOS ALBERTO IGLESIAS SALGADO

BETINA CHAIT

**Título:** ESTUDO DAS BASES MOLECULARES DO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO/HIPERATIVIDADE EM ADULTOS

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. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA.

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

Porto Alegre, 25 de janeiro de 2002.

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

## D. Aprovação da Comissão de Ética – controles



**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:** 01-321

Pesquisador Responsável:
PAULO SILVA BELMONTE DE ABREU

**Título:** ESTUDO DAS BASES MOLECULARES DO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO/HIPERATIVIDADE EM ADULTOS

**TCLE GRUPO CONTROLE**

**Data da Versão:**  
28/12/2007

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

Porto Alegre, 02 de janeiro de 2008.

  
Prof. Nadine Clausell  
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA