

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

O GENE DO TRANSPORTADOR DE DOPAMINA E A SUSCETIBILIDADE  
GENÉTICA AO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE  
ATENÇÃO/HIPERATIVIDADE EM CRIANÇAS

**JÚLIA PASQUALINI GENRO**

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

**Orientadora: Prof. Dra. MARA HELENA HUTZ**

Porto Alegre, setembro de 2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINACIADORAS**

---

As pesquisas foram realizadas no laboratório de DNA do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e foram subvencionadas pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto do Milênio, Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX, Brasil) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Brasil).

A aluna recebeu bolsa de estudos concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## **VERDADE**

**Carlos Drummond de Andrade**

**“A porta da verdade estava aberta,  
mas só deixava passar  
meia pessoa de cada vez.**

**Assim não era possível atingir toda a verdade,  
porque a meia pessoa que entrava  
só trazia o perfil de meia verdade.  
E sua segunda metade  
voltava igualmente com meio perfil.  
E os meios perfis não coincidiam.**

**Arrebentaram a porta. Derrubaram a porta.  
Chegaram ao lugar luminoso  
onde a verdade esplendia seus fogos.  
Era dividida em metades  
diferentes uma da outra.**

**Chegou-se a discutir qual a metade mais bela.  
Nenhuma das duas era totalmente bela.  
E carecia optar. Cada um optou conforme  
seu capricho, sua ilusão, sua miopia.”**

Dedico este trabalho a todas as famílias  
que participaram deste estudo doando seu  
sangue e suas esperanças à ciência. E  
também a todos pesquisadores que fazem  
da ciência uma busca pelo conhecimento,  
não um caminho para a verdade.

## AGRADECIMENTOS

---

Os agradecimentos talvez seja a parte mais difícil da tese. Nestes anos de trabalho muitas pessoas contribuíram para minha formação profissional e pessoal. Gostaria de agradecer todas elas. Mas como isto seria quase impossível tentarei fazer aqui um resumo da minha jornada científica agradecendo algumas pessoas fundamentais.

- Cheguei na sala da prof. Mara Hutz em 2001 pedindo um estágio, convicta que eu queria trabalhar com Genética Humana. A partir daí tudo começou...

Agradeço à minha orientadora Mara por tudo! Por todos os ensinamentos que me formaram pesquisadora. Pela confiança em mim e no meu trabalho, com certeza esta confiança foi um grande estímulo na minha jornada científica. Pelo carinho e amizade, por sempre me entender e me ouvir com interesse e paciência. Por conseguir ser ao mesmo tempo uma orientadora exigente e uma amiga querida.

- Logo que cheguei no laboratório, já estavam lá algumas pessoas, que hoje são grandes amigas:

À Marilu e Silvana, por serem tão atenciosas com as “iniciações”, por tudo que ensinaram com tanta paciência, pelo exemplo de conduta pessoal e profissional no laboratório. E pela parceria muito mais que animada para eventos étlicos.

À Sil por ter se tornado uma grande amiga, por compartilhar os mesmos princípios, por sempre me ouvir com paciência e sempre aconselhar com sensatez.

À Lú também pela amizade, por estar sempre disposta a ajudar e ensinar, sempre divertida, sempre com boas idéias.

À Vê Zembuski pela amizade desde o início, por ter me recebido de braços abertos no laboratório logo que cheguei. Por inúmeras parcerias no laboratório, em congressos, em jantinhas.

À Fabinha que me aproximei logo depois, e se tornou uma grande amiga. Por ser tão autêntica, por tantas conversas sérias, bobas e filosóficas, por tantas cantorias (Saltimbancos, Limãozinho, etc...) e tantos momentos divertidos.

- Em 2003 comecei a trabalhar com TDAH, e algumas pessoas foram muito importantes nesta etapa:

Ao prof. Rohde pela colaboração inestimável neste trabalho. Por ser um exemplo de dinamismo e dedicação à pesquisa, e por acreditar que o trabalho em grupo pode dar certo e por fazê-lo dar certo.

À Tatiana que me recebeu com entusiasmo no grupo, pela amizade, por começar esta pesquisa com TDAH, por me auxiliar nos assuntos científicos quando iniciei neste projeto.

À Ana Paula que entrou mais tarde no grupo, pela amizade, pela parceria nas viagens, nos congressos, por torcer por mim, pelas conversas da vida.

À Angélica que entrou recentemente no grupo, pela ajuda no laboratório na parte final do doutorado. Pena que foi no final! Pela amizade, seriedade no trabalho e vontade de aprender.

A toda equipe do PRODAH (Programa do Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade), em especial aos que participaram diretamente deste estudo com a coleta da amostra e avaliação clínica: Guilherme Polanczyk, Cristian Zeni, Marcelo Schmitz, Sílvia Martins, Silzá Tramontina, Claudia Szobot, e também a secretária do Programa, Clarissa Paim pela competência e bom humor nos assuntos burocráticos do grupo.

- Ainda devo agradecer a outras pessoas importantes ao longo desta jornada:

À prof. Sídia pelo auxílio nos assuntos estatísticos, por ser um exemplo de conduta, de vontade de ensinar e aprender.

Ao prof. Claiton pelo auxílio nos assuntos científicos, por estar sempre disposto a ajudar, discutir e contribuir com o trabalho científico.

À Vê Contini que conheci mais tarde nesta jornada, mas que considero minha amiga de infância. Pela cumplicidade, por todas as parcerias e afinidades no trabalho, na vida, e no vinho. Por estar sempre de bom humor e disposta a conversar (principalmente falar!).

A todos os colegas do laboratório 114 e 116, e das salinhas 109, 113, 117, que dividiram não apenas o espaço físico, mas muitos momentos agradáveis também. Com certeza não poderei falar de todos, mas cito alguns. Aqueles que já mudaram de nicho Bina, Erik, Marília, Everaldo. Aqueles que estão por aí Jana, Lú Gustavo, Eve, Lisa, Felipe. Aqueles recém chegados, Vinícius, Tati G.

Ao Elmo por toda dedicação ao Programa, pela competência e bom humor. E à Ellen pela boa vontade em ajudar o Elmo na difícil tarefa de fazer funcionar uma Pós-graduação.

- Agradeço também a minha família pelo suporte emocional que fez com que eu percorresse esta longa jornada sempre feliz:

À minha vó Elly e ao meu vô Adelmo (in memoriam) pelo exemplo de vida, de honestidade e solidariedade. Minha vó, em especial, pelo interesse e curiosidade nos assuntos científicos.

Ao meu pai Adelmo (in memoriam) pela inspiração e exemplo de amor ao conhecimento.

À minha mãe Letícia e à minha mana Bruna por serem os alicerces da minha vida, pelo amor irrestrito e apoio incondicional. Pelos valores compartilhados. Por eu me sentir sempre segura e amparada.

À família do meu marido, Loli, Antônio, Marcos e Abuela, por me adotarem com muito carinho, pelo estímulo para eu fazer o que gosto e acredito.

Ao meu marido Luis, por iluminar minha jornada com muito amor. Por acreditar em mim quando eu resolvi me dedicar à pesquisa, me incentivando sempre. Por ouvir meus lamentos na hora do cansaço e me dar força para ir em frente. Por eu me sentir feliz e amada.

---

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	12
Capítulo I. INTRODUÇÃO.....	14
I.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	15
I.2. NEUROBIOLOGIA DO TDAH.....	21
I.3. ETIOLOGIA.....	24
I.3.1. Fatores Ambientais.....	24
I.3.2. Fatores Genéticos.....	24
I.4. ESTUDOS GENÉTICOS MOLECULARES NO TDAH.....	27
I.4.1. Estudos de Ligação.....	27
I.4.2. Estudos de Associação.....	28
I.5. GENE DO TRANSPORTADOR DE DOPAMINA (SLC6A3 OU DAT1).....	32
I.5.1. Estrutura e função do gene.....	32
I.5.2. DAT e TDAH.....	36
I.5.3. Endofenótipos.....	42
Capítulo II. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS.....	43
Capítulo III. A PROMOTER POLYMORPHISM (- 839 C>T) AT THE DOPAMINE TRANSPORTER GENE IS ASSOCIATED WITH ATTENTION DEFICIT/HYPERACTIVITY DISORDER IN BRAZILIAN CHILDREN.....	46
Capítulo IV. A COMMON HAPLOTYPE AT THE DOPAMINE TRANSPORTER GENE 5' REGION IS ASSOCIATED WITH ATTENTION-DEFICIT/ HYPERACTIVITY DISORDER. ....	52
Capítulo V. NO ASSOCIATION BETWEEN DOPAMINERGIC POLYMORPHISMS AND INTELLIGENCE VARIABILITY IN ATTENTION-DEFICIT/HYPERACTIVITY DISORDER .....	83
Capítulo VI. DISCUSSÃO.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
ANEXOS.....	113



ANEXO I. Termo de aprovação do Projeto de Pesquisa no Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.....	114
--	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

---

CPF – Córtex pré-frontal  
DAT – Transportador de Dopamina  
DAT1 ou SLC6A3 – Gene Transportador de Dopamina  
DL – Desequilíbrio de Ligação  
DRD2 – Receptor de Dopamina tipo 2  
DRD3 – Receptor de Dopamina tipo 3  
DRD4 - Receptor de Dopamina tipo 4  
DRD5 – Receptor de Dopamina tipo 5  
HRR – Risco relativo de haplótipos  
5-HTLPR – Transportador de Serotonina  
HTR1B – Receptor de serotonina tipo 1B  
LPB1 – Proteína líder tipo B1  
NRSE – Elemento silenciador neuro-restritivo  
PET – Tomografia por emissão de pósitrons  
SNAP-25 – Proteína sinaptossômica tipo 25  
SNPs – Polimorfismos de base única  
SPECT – Tomografia por emissão de fótons únicos  
TDAH – Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade  
3' UTR – Região 3' não traduzida  
VNTR – Número variável de repetições em tandem

---

O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) está entre as doenças psiquiátricas mais comuns na infância e adolescência, afetando 5,3% de crianças em todo mundo. O TDAH é uma doença bastante heterogênea caracterizada por sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade, determinando prejuízo significativo na qualidade de vida dos pacientes. A partir destes sintomas três tipos clínicos são reconhecidos: predominantemente desatento, predominantemente hiperativo-impulsivo e combinado (combinação dos sintomas de ambos os grupos). Embora sua etiologia ainda não esteja totalmente esclarecida, existem fortes evidências mostrando que os genes desempenham um papel importante na doença. O transportador de dopamina (DAT) é uma proteína plasmática de membrana que controla a neurotransmissão dopaminérgica através da recaptação da dopamina liberada pelos neurônios pré-sinápticos. O DAT também é o principal sítio de ação do metilfenidato, que é o estimulante mais usado no tratamento do TDAH. O metilfenidato bloqueia a ação do DAT aumentando as concentrações sinápticas de dopamina. Esta evidência justifica o gene transportador de dopamina (DAT1 ou SLC6A3) como um candidato central no TDAH. A grande maioria dos estudos de associação com este gene concentram-se na região 3' não traduzida do gene (3' UTR), principalmente com um polimorfismo de número variável de repetições em tandem (VNTR), mas os resultados são bastante controversos. Embora a explicação mais utilizada para explicar os resultados divergentes é que o polimorfismo está em desequilíbrio de ligação (DL) com outro sítio funcional, somente dois estudos em populações europeias analisaram o gene como um todo. No presente estudo nós analisamos 16 polimorfismos ao longo do gene DAT1 no intuito de entender a estrutura do DL do gene e verificar se existe alguma transmissão preferencial das variantes estudadas (e haplótipos derivados) dos pais para os filhos afetados. A amostra foi composta de 243 famílias com pelo menos 1 filho afetado. Nós encontramos um padrão segmentado de DL com três blocos haplotípicos. Esta estrutura foi bastante similar aos resultados prévios descritos em populações europeias. Na amostra total foi observada uma transmissão preferencial do haplótipo (A/C/C/C/A) derivado de 5 SNPs da região promotora (rs2550948,

rs11564750, rs261759, rs2652511, rs2975223) dos pais para os filhos afetados ( $p=0,025$ ). Esta associação haplotípica se mostrou mais forte quando a análise foi restrita ao subtipo clínico combinado ( $p=0,003$ ). Não detectamos nenhuma outra associação com as demais variantes analisadas, incluindo o VNTR da região 3'. Em primeiro lugar nossos resultados sugerem um papel importante da região promotora do gene DAT1 na suscetibilidade genética ao TDAH na nossa população. Em segundo lugar, eles também sugerem fortemente que a questão da heterogeneidade alélica deve ser considerada em doenças complexas como o TDAH, pois a estrutura do DL parece não explicar as inconsistências em relação a este gene.

## ABSTRACT

---

Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is one of the most prevalent mental health disorders in childhood and adolescence, affecting 5.3% of children worldwide. ADHD is a very heterogeneous disorder characterized by symptoms of inattention, hyperactivity and impulsivity determining significant impairment across the life cycle. These symptoms define three clinical subtypes: mainly inattentive, mainly hyperactive-impulsive, or both combined. Although its etiology remains unclear, there is strong evidence supporting the role of genes in the disorder. The dopamine transporter (DAT) is a plasma membrane protein that controls dopaminergic neurotransmission by reuptake of released dopamine into presynaptic neurons. DAT is also the main target for methylphenidate (MPH), the most used stimulant for ADHD treatment. MPH blocks the action of DAT, increasing synaptic dopamine concentrations. This evidence justifies the dopamine transporter gene (DAT1 or SLC6A3) as a central candidate gene for ADHD. Most association studies of the DAT1 gene in ADHD are focused in the 3'-untranslated region of the gene (3'UTR) assessing mainly a variable number of tandem repeat (VNTR) polymorphism, but these investigations have reported discordant results. However, the most common explanation for these inconsistent results is variable linkage disequilibrium with an adjacent functional variant, only two studies in European populations have reported LD structure across the gene. In this study, we screened 16 polymorphisms across the DAT1 gene to understand LD structure in a Brazilian sample of families with ADHD probands and to verify if there were evidence for a biased transmission of alleles and haplotypes from parents to their affected children. The sample included 243 families with at least one affected child. We found a segmental pattern of LD with three haplotype blocks. Moreover, the LD structure observed here was very similar to those previous described for European populations. The promoter haplotype A/C/C/C/A derived from five SNPs (rs2550948, rs11564750, rs261759, rs2652511, rs2975223) in the 5' region was significantly more transmitted to ADHD probands ( $p=0.025$ ). This association was strengthened when the analyses were restricted to patients with the combined type only ( $p=0.003$ ). We observe no preferential transmission of any allele/haplotype at the 3' region of the gene, including the 3' VNTR.

First, these results suggest a role for the promoter region in ADHD susceptibility in our Brazilian population. Second, allele heterogeneity should be highly considered in complex diseases like ADHD, because LD structure could not explain the inconsistencies about this gene in ADHD.

---

**Capítulo I**  
**INTRODUÇÃO**

---

## 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) é uma das doenças psiquiátricas mais comuns na infância e na adolescência. Os principais sintomas que caracterizam o TDAH são a desatenção, a hiperatividade e a impulsividade, que afetam de modo adverso o desempenho acadêmico, as relações familiares e o ajustamento social. A primeira referência ao transtorno na literatura médica foi em 1902 (Still, 1902), desde então, sua nomenclatura já sofreu algumas alterações. Na década de 40, surgiu a designação lesão cerebral mínima que em 1962 foi modificada para disfunção cerebral mínima, reconhecendo-se que as alterações características da síndrome relacionam-se mais a disfunções em vias nervosas do que propriamente a lesões nas mesmas (Rohde e cols., 2000). Os sistemas classificatórios modernos utilizados em psiquiatria DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994) e CID-10 (Organização Mundial de Saúde, 1993) apresentam nomenclaturas diferentes para o transtorno: Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade no DSM-IV e transtornos hipercinéticos no CID-10 (Rohde e Halpern, 2004). No entanto, cabe ressaltar que estes sistemas apresentam mais similaridades do que diferenças nas diretrizes diagnósticas para a doença.

A doença é aproximadamente 4 vezes mais comum em meninos do que meninas (Biederman, 1998; Rohde e cols., 1999). A prevalência deste transtorno em crianças tem se mostrado bastante variável na literatura com taxas que variam desde 1% até próximo de 20 %, embora a grande maioria dos estudos fique na faixa de 3 a 6 % (Farone e cols., 2003). É importante salientar que a taxa de prevalência é dependente de vários aspectos. Entre eles, poderíamos destacar: tipo de amostra (proveniente de hospital ou da comunidade), delineamento do estudo, fonte de informação, critérios diagnósticos utilizados, bem como a idade e o sexo da população em estudo. Tendo em vista que os estudos na América do Norte apresentam geralmente, prevalências superiores aos estudos na Europa, alguns autores sugeriram que esta variação estaria indicando que o TDAH seria produto de fatores culturais norte-americanos (Anderson, 1996; Timimi e Taylor, 2004). Esta proposta gerou um



duro debate na literatura. No entanto, esta discussão, hoje, parece estar ultrapassada, uma vez que muitos estudos mostraram que as diferenças encontradas nas taxas de prevalência refletem muito mais diferenças metodológicas do que reais diferenças transculturais no construto diagnóstico do transtorno (Faraone e cols., 2003; Rohde e cols., 2001; 2005). Um estudo recente realizou uma meta-análise para calcular a prevalência mundial para crianças e entender os aspectos que influenciavam as diferenças nas taxas ao redor do mundo. Estes autores analisaram 102 estudos de todos os continentes e estimaram uma prevalência de 5,29%, concluindo que a variabilidade na prevalência parece ser mais explicada por diferenças metodológicas entre os estudos do que a localização geográfica destes (Polanczyk e cols., 2007).

O diagnóstico do TDAH é fundamentalmente clínico, baseando-se em critérios operacionais claros e bem definidos, proveniente de sistemas classificatórios como a quarta edição do DSM-IV, Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais (American Psychiatric Association, 1994). Além de ser o critério mais utilizado na literatura, o DSM-IV já foi sugerido por estudo prévio como aplicável e adequado para o estudo do TDAH na nossa população (Rohde e cols., 2001). O DSM-IV 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, no mínimo por 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 apresenta seis ou mais sintomas do primeiro grupo, o indivíduo é classificado como predominantemente desatento, no segundo como predominantemente hiperativo-impulsivo e se apresentar seis sintomas, no mínimo, em cada um dos grupos, o indivíduo será do tipo combinado. A prevalência de cada tipo na população é bastante variável, em amostras provenientes de hospitais, o tipo combinado é o mais comum, seguido do desatento e por último o tipo hiperativo-impulsivo (Faraone e cols., 1998). O tipo com predomínio de sintomas de desatenção e o tipo combinado parecem apresentar uma taxa mais elevada de prejuízo acadêmico. As crianças com TDAH com predomínio de sintomas de hiperatividade/impulsividade, por outro lado, são mais

agressivas e impulsivas do que as crianças com os outros dois tipos e tendem a apresentar altas taxas de rejeição pelos colegas. O tipo combinado apresenta um maior prejuízo no funcionamento global quando comparado aos outros grupos.

É importante salientar que a desatenção, a hiperatividade ou a impulsividade como sintomas isolados podem resultar de muitos problemas na vida de relação das crianças (com os pais e/ou colegas e amigos) e de sistemas educacionais inadequados, ou podem estar associados a outros transtornos comumente encontrados na infância e na adolescência. Portanto, para o diagnóstico do TDAH, é sempre necessário contextualizar os sintomas na história de vida da criança.

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 e cols. (2001) estimaram que 60 a 70% das crianças que apresentavam TDAH continuavam com esse diagnóstico na vida adulta. A maioria dos estudos que analisa a persistência na vida adulta encontra taxas consideráveis, que variam de 58 a 80%, mostrando que a doença tende a ser crônica (Biederman e cols., 2000; Manuzza e cols., 2003).

O TDAH, assim como as demais doenças psiquiátricas, apresenta uma alta prevalência de comorbidades. Os transtornos disruptivos do comportamento (transtorno de conduta e transtorno oppositor desafiante) são os mais freqüentemente diagnosticados, aparecendo em 30 a 50% dos casos de TDAH. No nosso meio Rohde e cols. (1999) encontraram uma taxa de comorbidade de 47,8% com estes transtornos. Outras doenças que aparecem freqüentemente associadas ao TDAH são: transtornos de ansiedade (em torno de 25%), transtornos de aprendizagem (10 a 25%) e depressão (15 a 20%) (Biederman, 1998).

Ao longo do desenvolvimento, o TDAH está associado com um risco aumentado de baixo desempenho escolar, repetências, expulsões e suspensões escolares, relações difíceis com familiares e colegas, desenvolvimento de ansiedade e depressão, baixa auto-estima, problemas de conduta e delinquência, experimentação e abuso de

drogas precoce, acidentes de carro, assim como dificuldade de relacionamento na vida adulta, no casamento e no trabalho (Barkley e cols. 2002). A alta prevalência deste transtorno aliada ao grande prejuízo na qualidade de vida de seus portadores e de seus familiares determinam um grande impacto do TDAH na sociedade.

O tratamento para o TDAH envolve basicamente dois tipos de intervenções: as psicossociais onde os pais e a escola têm papel fundamental, e as farmacoterápicas, onde a intervenção medicamentosa é aplicada. Em relação à abordagem psicossocial se mostra fundamental que os pais e professores estejam suficientemente informados para saber manejar os sintomas das crianças no intuito de fornecer um ambiente mais adequado para a adaptação e aprendizado. Já no que diz respeito às intervenções focadas na criança, a modalidade psicoterápica mais estudada e com maior evidência de eficácia para os sintomas centrais do transtorno é a cognitivo-comportamental. Em relação às intervenções farmacológicas, os estimulantes são claramente apresentados como as medicações de primeira escolha para o transtorno. No Brasil, o único estimulante encontrado no mercado é o metilfenidato (Ritalina®) recentemente disponível em duas novas formulações de efeito prolongado (Concerta® e Ritalina LA®). As formulações de liberação prolongada são consideradas, além de mais práticas, mais seguras, pois diminuem o risco do efeito de reforço causado por súbitos aumentos do nível plasmático de metilfenidato, reduzindo o potencial de abuso ao mesmo tempo em que mantém a ação terapêutica (Volkow, 2006). A dose terapêutica normalmente se situa na faixa de 20 a 60 mg/dia. Cerca de 70% dos pacientes com TDAH respondem adequadamente aos estimulantes, com redução de pelo menos 50% dos sintomas básicos do transtorno. Os efeitos adversos mais freqüentemente associados ao uso de estimulantes são: perda de apetite, insônia, irritabilidade, cefaléia e sintomas gastro-intestinais (Spencer e cols., 1996). Os antidepressivos tricíclicos também apresentam eficácia no tratamento do TDAH, sendo o mais utilizado a imipramina (Tofranil®, Imipra®). Eles normalmente são a segunda escolha de tratamento, pois apresentam eficácia reduzida quando comparados aos estimulantes. Por este motivo, eles são indicados quando não há resposta aos estimulantes e na presença de comorbidades de tique ou enurese (Biederman, 1998).

Um ensaio clínico multicêntrico acompanhou quatro abordagens diferentes de tratamento em 579 crianças com TDAH por 14 meses. Os quatro grupos de abordagem eram: tratamento apenas medicamentoso, apenas psicoterápico comportamental com as crianças e orientação para pais e professores, abordagem combinada e tratamento comunitário. Este trabalho mostrou claramente uma eficácia superior da medicação nos sintomas centrais do transtorno quando comparado a abordagem psicoterápica e ao tratamento comunitário. A abordagem combinada (medicação + psicoterápica com orientação para pais e professores) não resultou em eficácia maior nos sintomas centrais do transtorno quando comparado apenas a abordagem medicamentosa (The MTA Cooperative group, 1999).

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 atuam sobre diferentes sistemas, especialmente o noradrenérgico.

**Tabela 1:** Sintomas do TDAH de acordo com o DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994).

<b>Desatenção</b>	<b>Hiperatividade</b>	<b>Impulsividade</b>
<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>		

## 1.2 NEUROBIOLOGIA DO TDAH

O substrato neurobiológico do TDAH vem sendo objeto de muitos estudos, embora ainda não tenhamos um esclarecimento completo sobre este tema. Parece consenso que existe uma disfunção cerebral no transtorno, mas os processos biológicos implicados nesta disfunção ainda não estão totalmente entendidos. Considerando a alta heterogeneidade do transtorno no que diz respeito as suas manifestações clínicas, espera-se que os processos cerebrais envolvidos sejam igualmente complexos.

Dados de estudos neuropsicológicos mostraram que crianças com TDAH tem 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., 1998; Tannock, 1998). Além das funções anormais e do tamanho reduzido do córtex pré-frontal (CPF) em pessoas com TDAH, lesões desta estrutura no hemisfério cerebral direito produzem sintomatologia muito semelhante a do transtorno (Arnsten e Li, 2005).

Estudos neuropsicológicos, de neuroimagem e de neurotransmissores convergem para uma disfunção fronto-subcortical envolvida no transtorno, embora atualmente outras regiões são apontadas como importantes para base neurobiológica do transtorno, como o cerebelo e o corpo caloso.

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).

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., 1998; Arnsten e Li, 2005). 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 também parece ter especial relevância na patofisiologia do TDAH. Os circuitos fronto-subcorticais possivelmente implicados no transtorno, são ricos tanto em dopamina como em noradrenalina (Faraone 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). Um excesso de noradrenalina nesta região também seria responsável por uma diminuição na inibição comportamental através de inputs noradrenérgicos aumentados na região cortical. Essas disfunções noradrenérgicas interfeririam ainda, na transmissão dopaminérgica em outras áreas do cérebro. Barkley (1997) propõe uma teoria incluindo ambos sistemas de neurotransmissores: o déficit central no TDAH seria uma falha na inibição comportamental. Essa falha causaria os sintomas vistos nos pacientes, como hiperatividade, desatenção, distração e impulsividade. Dois sistemas neuroanatômicos distintos, o anterior e o posterior poderiam estar envolvidos na origem e na manutenção do TDAH. O sistema anterior, primariamente dopaminérgico, envolveria sobretudo áreas corticais frontais. Já o sistema posterior, noradrenérgico, incluiria áreas como a região parietal e o locus coeruleus. Além do que, a eficácia clínica dos estimulantes provavelmente depende de alterações em funções dopaminérgicas e noradrenérgicas.

Mais recentemente, estudos de neuroimagem assumiram o foco para compreender a neurobiologia do transtorno. Embora existam limitações consideráveis na técnica, estes estudos mostram-se bastante adequados para este fim, seja através de estudos estruturais: Ressonância magnética e tomografia computadorizada; e/ou estudos funcionais: Ressonância magnética funcional, tomografia por emissão de pósitrons (PET), tomografia por emissão de fótons únicos (SPECT).

Estudos estruturais de neuroimagem demonstraram algumas alterações consistentes no cérebro de pacientes com TDAH. Hoje, é amplamente aceito na literatura que os cérebros de crianças com TDAH são significativamente menores, em média, do que cérebros de crianças controle (Castellanos e cols., 2002; Durston e cols., 2004). Uma recente meta-análise de estudos de imagem estruturais confirma uma redução global do cérebro para pacientes com TDAH e indica que as maiores diferenças encontram-se no vermis cerebelar, no corpo caloso, no volume cerebral total e direito; e no caudato direito (Valera e cols., 2007). Estudos de neuroimagem funcionais corroboram os estudos estruturais sugerindo um déficit no sistema fronto-subcortical pra explicar a patofisiologia do TDAH. No entanto existe menos concordância nestes estudos quanto à localização exata das estruturas e a lateralização das mesmas.

Um estudo recente propõe que a natureza da disfunção cerebral no TDAH possa estar relacionada a um atraso na maturação do córtex (Shaw e cols., 2007). Este estudo comparou 223 imagens cerebrais de crianças com TDAH com 223 imagens de crianças sem a doença, e concluiu que o padrão do desenvolvimento cerebral é semelhante entre os dois grupos, porém o desenvolvimento difere no tempo, ou seja, a doença parece estar mais relacionada a um atraso no desenvolvimento do que a um desvio neste processo. O atraso na maturação foi mais proeminente em regiões pré-frontais. Essas regiões são importantes no controle de processos cognitivos e foram previamente implicadas no TDAH.



### 1.3 ETIOLOGIA

A 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 um papel importante no surgimento e na manutenção da doença (Faraone e Biederman 1998). Algumas adversidades sociais como discórdia marital grave, classe social baixa, família muito numerosa, criminalidade dos pais, psicopatologia materna e colocação em lar adotivo, já foram associadas com o TDAH (Biederman e cols., 1995). Estudos que focam a associação entre TDAH e complicações na gestação ou no parto apóiam a idéia de que problemas como toxemia, eclâmpsia, duração do parto, estresse fetal, baixo peso ao nascer e má saúde materna, predisponham ao TDAH (Faraone e Biederman, 1998). 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 que afetam processos específicos implicados no transtorno, como, por exemplo, danos cerebrais perinatais no lobo frontal, podem relacionar-se indiretamente com a doença, já que atingem processos de atenção, motivação e planejamento (Levy e cols., 1998).

#### 1.3.2 Fatores Genéticos

Os estudos genéticos clássicos sugerem uma importante contribuição de fatores hereditários 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). Levando em consideração que os estudos genéticos com famílias não permitem desvincular os fatores genéticos do ambiente compartilhado, estudos com adotados mostram-se adequados para contornar este viés. 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; Sprich e cols., 2000). Os estudos com gêmeos demonstraram grande concordância para esta doença, 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). Faraone e cols. (2005), revisando 20 estudos com gêmeos, estimou uma herdabilidade de 76% e sugeriu que talvez o TDAH seja o distúrbio com o maior componente hereditário dentro da psiquiatria.

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. Hoje em dia, o mais aceito é que a transmissão do TDAH ocorre através de vários genes de pequeno efeito, que interagem entre si e com o ambiente, conferindo suscetibilidade ao transtorno (Nigg e Goldsmith, 1998; 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 eles atuem (State e cols., 2000). Mais do que isso, os fatores genéticos que influenciam a origem do TDAH podem ser diferentes daqueles que atuam ao longo dos estágios de desenvolvimento do indivíduo, por exemplo, os genes que contribuem para o TDAH na infância podem não ser os mesmos para os casos em adolescentes. E ainda estes componentes genéticos podem ser distintos no que se refere ao curso, desfecho e presença de comorbidades (Thapar e cols., 2007).

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). Considerando que o TDAH apresenta casos muito diversos, ou seja, uma significativa heterogeneidade clínica, é bem provável que isso 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 uma alta herdabilidade tenha sido descrita em muitos estudos, essas estimativas foram obtidas considerando 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 ESTUDOS GENÉTICOS MOLECULARES NO TDAH

Os estudos genéticos moleculares de doenças complexas testam associação e/ou ligação entre a doença e genes específicos ou regiões do genoma. Geralmente os estudos de associação são baseados na clássica abordagem caso-controle. Já os estudos de ligação clássicos verificam se existe uma co-segregação de alguma variante do DNA com a doença em famílias grandes e multigeracionais. No estudo do TDAH os métodos de associação mais utilizados são refinamentos da abordagem caso-controle, como os métodos baseados em famílias, onde os alelos transmitidos e não-transmitidos dos pais para filhos afetados são comparados para detectar distorções de segregação. Em relação aos estudos de ligação para o TDAH, estes, se baseiam mais freqüentemente em um número grande de famílias nucleares (pai, mãe e filho afetado) ou pares de irmão afetados onde se buscam alelos compartilhados através de uma varredura genômica.

### 1.4.1 Estudos de Ligação

Os estudos de ligação começaram bem recentemente no TDAH, no entanto eles vêm se desenvolvendo com bastante rapidez. Desde o primeiro estudo de varredura genômica publicado por Fisher e cols. em 2002, que foi estendido por Ogdie e cols. em 2004, mais seis estudos já foram publicados. Destes, dois foram baseados em famílias multigeracionais, um proveniente de uma população isolada da Colômbia (Arcos-Burgos e cols., 2004) e o outro proveniente da Alemanha (Romanos e cols. 2008). Os demais estudos foram realizados com famílias de pares de irmãos afetados de diferentes países: Holanda (Bakker e cols., 2003), Estados Unidos (Ogdie e cols., 2004; Asherson e cols., 2008; Faraone e cols., 2007), Alemanha (Hebebrand e cols., 2006). Dos resultados destes estudos identificaram-se várias regiões onde foi detectada ligação ou sugestão de ligação com o TDAH. Muitas destas regiões não foram

replicadas, portanto as regiões identificadas em mais de um estudo são as mais sugestivas para exercer um papel relevante neste transtorno. O braço curto do cromossomo 5 foi identificado em quatro estudos (Bakker e cols., 2003; Ogdie e cols., 2004; Arcos-Burgos e cols., 2004; Hebebrand e cols., 2006), assim como o braço longo do 9 (Asherson e cols., 2008; Hebebrand e cols., 2006; Bakker e cols., 2003; Romanos e cols., 2008). O braço curto do cromossomo 17, bem como o braço longo do 11, mostraram picos sugestivos em três estudos (Ogdie e cols., 2004; Arcos-Burgos e cols., 2004; Hebebrand e cols., 2006). Ogdie e cols. (2006) publicaram uma análise conjunta com dois destes estudos prévios (Ogdie e cols., 2004; Arcos-Burgos e cols., 2004) e sugeriram que embora a região 5p pareça ser uma região de risco comum para o TDAH, existe uma grande heterogeneidade genética entre os estudos. A ausência de replicação para a maioria das regiões onde foi identificada ligação com a doença sugere que existem diferenças importantes no background genético das populações estudadas, ou seja, as populações podem diferir nas regiões de suscetibilidade para o transtorno. Já Faraone e cols. (2008) num estudo com 600 pares de irmãos afetados não encontrou nenhum pico de ligação com a doença corroborando a hipótese de que os genes que contribuem para o fenótipo têm efeito modesto. A grande vantagem dos estudos de ligação é que eles não necessitam uma hipótese a priori, permitindo a identificação de novos genes. Estes estudos, entretanto, têm um poder estatístico reduzido, e talvez, por este motivo, esta não seja a abordagem ideal para doenças complexas onde os genes exercem isoladamente efeitos pequenos. Portanto, os estudos de associação, ainda parecem ser a ferramenta mais adequada e mais promissora para estudar os genes de suscetibilidade para o TDAH (Mick e Faraone, 2008).

#### 1.4.2 Estudos de Associação

Em contraste com o pequeno número de estudos de ligação no TDAH, muitos estudos de associação foram e vêm sendo conduzidos no intuito de identificar possíveis genes de suscetibilidade para essa doença. Todavia esta abordagem no TDAH também é relativamente recente, uma vez que o

primeiro relato de associação entre um marcador genético e o TDAH foi publicado em 1995 (Cook e cols., 1995).

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 a suscetibilidade ao TDAH.

O sistema dopaminérgico vem sendo o foco principal destes estudos. Um dos primeiros candidatos foi o gene do transportador de dopamina (DAT1), pois esta proteína é inibida pelos estimulantes usados no tratamento do TDAH, impedindo a recaptação da dopamina na fenda sináptica (Seeman e Madras, 1998). Outro gene do sistema dopaminérgico intensamente investigado é o gene do receptor D4 de dopamina (DRD4). O grande interesse por esse 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 TDAH com um polimorfismo do gene DRD4. Estes autores verificaram associação com o alelo de 7 repetições (48pb) de um VNTR (número variável de repetições em tandem) no éxon 3 do gene. Embora muitas investigações posteriores tenham replicado a associação com este gene, os resultados ainda são bastante controversos, dependendo bastante da estratégia de análise utilizada. Roman e cols. (2001) observaram uma interação entre os genes DRD4 e DAT1 sobre escores de hiperatividade/impulsividade. 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. Apesar dos resultados divergentes, recentemente duas meta-análises foram publicadas confirmando a associação do TDAH com o VNTR do éxon 3 do gene DRD4 (Faraone e cols., 2005; Li e cols., 2006).

Praticamente todos os demais genes conhecidos do sistema dopaminérgico foram objeto de estudos de associação com TDAH, incluindo DRD2, DRD3 e DRD5. Os estudos relacionados com os genes DRD2 e DRD3 ainda não permitiram conclusões definitivas quanto ao papel destes genes no TDAH (DiMaio e cols., 2003). Reunindo os dados relativos a estes genes Faraone e cols. (2005) sugerem que eles

não estejam associados ao TDAH ou tenham um papel muito pequeno. Quanto ao gene DRD5, foi publicada uma meta-análise reunindo 14 amostras independentes confirmando a associação deste gene com o TDAH. Este trabalho detectou associação com um polimorfismo de microssatélite na região 5' do gene com o tipo clínico predominantemente desatento e com o tipo combinado (Lowe e cols., 2004).

Além dos genes relacionados ao sistema dopaminérgico, muitos outros genes já foram estudados no TDAH, alguns dos quais se mostraram associados com TDAH. A tabela 2 mostra os 8 genes, nos quais alguma variante já foi investigada em três ou mais análises do tipo caso-controle ou de associação baseada em famílias. É importante salientar que, destes, 7 obtiveram resultados significativos (Tabela 2), embora com OR's bastante pequenas (1.13 -1.46). Estes achados também são consistentes com a idéia de que a vulnerabilidade genética ao TDAH seja mediada por muitos genes de pequeno efeito (Faraone e cols., 2005).

**Tabela 2:** Resultados de meta-análises para genes com variantes examinadas em mais de 3 estudos de caso-controle ou família com resultados significativos (Faraone e cols., 2005).

<b>Gene (Polimorfismo)</b>	<b>Tipo de estudo</b>	<b>OR</b>	<b>95% CI</b>
Receptor D4 de dopamina - DRD4 (VNTR no éxon 3)	Família	1.16	1.03-1.31
Receptor D4 de dopamina - DRD4 (VNTR no éxon 3)	Caso-controle	1.45	1.27-1.65
Receptor D5 de dopamina - DRD5 (repetição CA, 148 pb)	Família	1.24	1.12-1.38
Transportador de dopamina - DAT1 (3' VNTR )	Família	1.13	1.03-1.24
Dopamina beta hidroxilase - DBH (Taq I)	Caso-controle	1.33	1.11-1.59
Proteína associada a sinaptossoma - SNAP-25 (T1065G)	Família	1.19	1.03-1.38
Transportador de serotonina - 5HTT (Inserção/deleção 44pb)	Caso-controle	1.31	1.09-1.59
Receptor de serotonina - HTR1B (G861C)	Família	1.44	1.14-1.83



## 1.5 GENE DO TRANSPORTADOR DE DOPAMINA (DAT1 ou SLC6A3)

### 1.5.1 Estrutura e Função do Gene

O Transportador de dopamina (DAT) é uma proteína transmembrana com 620 aminoácidos, expressa seletivamente em neurônios dopaminérgicos pré-sinápticos. Ela faz parte da grande família de transportadores dependentes de sódio e cloreto e possui como os demais membros da família 12 domínios transmembrana. O DAT media a recaptação de dopamina na fenda sináptica após sua liberação, controlando temporal e espacialmente a atividade de liberação e recaptação de dopamina nos terminais pré-sinápticos. Esta proteína desempenha, portanto, um papel fundamental na regulação da neurotransmissão dopaminérgica e conseqüentemente na regulação das funções motoras, emocionais, cognitivas e endócrinas.

O DAT é o alvo principal dos psicoestimulantes (cocaína, anfetamina e metilfenidato), cujos efeitos neuropsiquiátricos corroboram a importância da dopamina e do DAT em muitas doenças neurológicas e psiquiátricas (Bannon e cols., 2001). A hipótese inicial para os efeitos terapêuticos do metilfenidato relaciona a melhora dos sintomas nos pacientes com a função dopaminérgica. Diversos estudos de neuroimagem sugeriram que o bloqueio prolongado dos transportadores de dopamina pelo metilfenidato, além de aumentar a concentração de dopamina (Seeman e Madras, 1998; Vaidya e cols., 1998; Volkow e cols., 2002), também amplifica a magnitude e duração dos estímulos induzidos pelo aumento de dopamina (Volkow e cols., 2002; 2005). Um estudo de ressonância magnética funcional sugeriu que o metilfenidato aumenta a ativação da região dorsal anterior do córtex cingulado médio e deve agir, em parte, normalizando a hipofunção dessa região em pacientes com TDAH (Bush e cols., 2008).

O gene que codifica a proteína, denominado gene DAT ou SLC6A3, foi mapeado na região 5p15.3 (Giros e cols., 1992; Vandenberg e cols., 1992) e consiste de 15 éxons intercalados por 14 íntrons totalizando uma extensão de mais de 60 Kb. A porção codificadora começa dentro do éxon 2 e termina no início do éxon 15. O gene

tem um único sítio para o início da transcrição e muitos éxons individuais codificam um único domínio transmembrana (Bannon e cols., 2001).

Muitos polimorfismos já foram descritos neste gene, tanto na região codificadora quanto intrônica, no entanto, o polimorfismo mais intensamente investigado é um VNTR no éxon 15 na região 3' não traduzida do gene. Dez alelos diferentes já foram identificados correspondendo à presença de 3 a 13 cópias da unidade de repetição de 40 pb. O alelo de 10 cópias é o mais prevalente em todo mundo (10R), embora o alelo de 9 repetições também seja comum em muitas populações (Kang e cols., 1999). Embora esta variante tenha sido a mais estudada, ainda não é claro se ela possui uma relevância funcional ou estrutural na proteína, visto que se encontra numa região não codificadora. No entanto, evidências recentes sugerem que tanto a região 3' quanto o VNTR desta região podem influenciar na regulação da transcrição e da tradução (Nakamura e cols., 1998; Mill e cols., 2002). Muitos estudos vêm sendo realizados no intuito de verificar se as variantes deste VNTR afetam diferentemente algum fenótipo relacionado à proteína, tanto em relação à expressão do gene, através de estudos *in vitro*, como aos níveis desta proteína no cérebro, através de estudos *in vivo* de neuroimagem. A maioria destes estudos encontra associação com o fenótipo, embora os resultados sejam bastante divergentes. De qualquer maneira, o mecanismo molecular pelo qual as diferenças alélicas possam alterar a função do gene permanece obscuro.

Como os estudos na região 3' não conseguiram detectar um papel funcional deste VNTR, os pesquisadores voltaram-se para outras regiões do gene que pudessem estar em desequilíbrio de ligação com ele, no intuito de identificar polimorfismos ou regiões funcionais no gene. Grunhage e cols. (2000) analisaram toda a região codificadora e os limites éxon-íntron do gene DAT em pacientes com transtorno bipolar e controles. Eles encontraram 5 variantes nas regiões flangeadoras éxon-íntron, mas que não alteravam o sítio de splicing. Na região codificadora, 3 variantes que não alteravam o aminoácido foram detectadas e 2 mutações raras, uma conservativa e outra não. Outros dois estudos que analisaram a seqüência do gene em diferentes doenças (Vanderbergh e cols., 2000; Morino e cols., 2000) também encontraram pouca variação na região codificadora e todos SNPs identificados não trocavam o aminoácido.

Os resultados destes estudos indicam que o gene DAT é altamente conservado com poucas variantes de substituição na região codificadora, sugerindo que a variação no nível de expressão possa ser determinada por mutações em regiões reguladoras.

Estudos que enfocam a seqüência da região 5' do gene tem fornecido evidências que esta região está envolvida na regulação da transcrição. Experimentos *in vitro* têm apontado para a existência de um forte promotor não específico sobreposto ao sítio de início da transcrição (-240 até +45pb). A presença de um promotor forte não específico sugere a presença de elementos silenciadores que definem a especificidade da expressão do DAT. Seqüências dentro do íntron 1 já foram sugeridas como silenciadores neuro-específicos. (Kouzmenko e cols., 1997; Sacchetti e cols., 1999). Bannon e cols. (2001) sugerem um potencial elemento silenciador neuro-restritivo (NRSE) numa região 5' mais distal do gene (-3024pb), concluindo que provavelmente muitos elementos silenciadores se combinem para reprimir a forte atividade basal do promotor em células que não expressam a proteína.

Rubie e cols. (2001) detectaram cinco polimorfismos bialélicos na região promotora em uma população caucasóide, sugerindo, após análises *in silico*, que todas as variantes são potenciais sítios de ligação para fatores regulatórios. Dentre estes polimorfismos, os autores sugerem que o -839C/T introduza um sítio de ligação para uma proteína líder (LBP-1). LBP-1 é uma proteína celular induzida pelo vírus da AIDS (vírus da imunodeficiência adquirida) que reprime o fator de transcrição do HIV1. Algum fator de transcrição semelhante ao LBP-1 poderia ligar-se em torno do -839C/T e reprimir a expressão do gene. Kelada e cols. (2005) ampliaram a análise da região 5' identificando 22 SNPs desde regiões mais distais a 5' (-5000 pb) até o início do éxon 2 (+2106 pb). Os autores verificaram que estes SNPs segregavam em 8 haplótipos, 6 dos quais eram comuns. A partir de experimentos *in vitro* foi observado que os 6 haplótipos mais comuns diferiam significativamente na expressão do gene e que os dois haplótipos mais freqüentes possuíam uma diferença de atividade de 37%.

Greenwood e cols. (2001) analisaram 14 SNPs que compreendiam desde a região promotora até o VNTR na região 3' e encontraram um haplótipo da região 3' com 4 SNPs (entre éxon 9 e éxon 15) mais o 3' VNTR em desequilíbrio de ligação com o transtorno bipolar. Em um estudo posterior o mesmo grupo analisou os mesmos 14

SNPs mais o VNTR da região 3' para caracterizar as relações de Desequilíbrio de Ligação (DL) entre eles, bem como ao longo do gene (Greenwood e cols., 2002). Neste trabalho foi observado um desequilíbrio de ligação segmentado no gene, com alto grau de DL na região 5' cobrindo aproximadamente 27 Kb (região promotora distal até o éxon 6) e na região 3' aproximadamente com 20 Kb (éxon 9 até o éxon 15). Em ambas as regiões foi possível identificar 2 clados distintos, embora a região 3' apresente maior variabilidade. Como a maioria das variantes da região 5' provém de regiões regulatórias, os autores sugerem que exista uma diferença funcional entre os dois clados que tenha sido mantida por seleção dentro da população. Entre as duas regiões o desequilíbrio não foi significativo, provavelmente devido a um *hotspot* de recombinação perto do meio do gene, revelando uma estrutura complexa resultante tanto de recombinação quanto de mutação. A relativa falta de DL entre os SNPs das duas regiões também pode indicar a presença de duas regiões funcionalmente distintas no gene, sugerindo que os estudos com haplótipos sejam conduzidos para cada região separadamente, pois os haplótipos compreendendo todo o gene podem não ser informativos.

Greenwood e Kelsoe (2003) analisaram, através de experimentos *in vitro*, regiões promotoras e intrônicas potencialmente regulatórias quanto a sua influência na expressão do gene DAT. Eles encontraram diferença significativa na atividade regulatória referente aos 2 haplótipos da região 5' que representavam os dois clados previamente descritos. Esses investigadores também não detectaram efeito dos alelos do VNTR, no entanto sugeriram que os íntron 9, 12 e 14 possam conter elementos reforçadores. Um SNP localizado no centro promotor (71 pb a 5' do éxon 1) parece ter atividade relevante na expressão, podendo ser um sítio para ligação de fatores de transcrição. O íntron 14 também demonstrou ser promissor, pois seus dois alelos apresentaram diferença significativa quanto à expressão. Os resultados sugerem que muitos SNPs possam contribuir, cada um com pequeno efeito, na regulação do gene. Além disso, poderiam existir vários elementos regulatórios na região 3' que em combinação com elementos da 5' regulassem diferencialmente a expressão do gene DAT, corroborando a importância de seqüências não codificantes em fenótipos complexos.

Os padrões de variação do genoma, ou mesmo dentro de um gene podem se úteis para mapear genes que influenciam doenças complexas. Estudos de desequilíbrio de ligação que usam SNPs podem fornecer uma alternativa eficiente aos estudos com microssatélites, uma vez que estes são mais abundantes e menos suscetíveis a mutações. Haplótipos multialélicos compreendendo vários SNPs são mais informativos que SNPs individuais e podem ser extremamente úteis para determinar a significância de um gene candidato numa doença específica bem como estreitar a região de interesse no loco relacionado à doença em questão. No entanto, a utilidade de tais haplótipos pode ser maximizada quando a relação do desequilíbrio de ligação entre os SNPs for considerada (Hartl & Clark., 1990).

### 1.5.2 DAT1 e TDAH

O gene que codifica a proteína transportadora de dopamina foi o candidato inicial para estudos moleculares com o TDAH, pois a proteína codificada é inibida pelos estimulantes utilizados no tratamento do transtorno, diminuindo a recaptação de dopamina na fenda sináptica. Estudos de neuroimagem mostraram que pacientes com TDAH apresentavam um aumento significativo da densidade do transportador de dopamina no striatum e com administração do metilfenidato esta concentração diminuía consideravelmente (Dougherty e cols., 1999; Krause e cols., 2000; Dresel e cols., 2000). Além disto, o gene fica no braço curto do cromossomo 5, região onde foi identificada ligação consistente com TDAH (Bakker e cols., 2003; Ogdie e cols., 2004; Arcos-Burgos e cols., 2004; Hebebrand e cols., 2006; Ogdie e cols., 2006).

O primeiro relato de associação do gene DAT1 com a doença foi feito por Cook e cols. (1995). Estes autores investigaram o polimorfismo do VNTR localizado na região 3' do gene. Através do método HRR (Risco Relativo de Haplótipos), foi detectada uma associação com o alelo de 480pb, correspondente a 10 cópias de unidade de repetição de 40pb (alelo 10R). Vários estudos posteriores tentaram replicar esta associação inicial, os resultados estão apresentados na Tabela 3. Dos estudos

realizados que analisaram associação deste VNTR com o TDAH um pouco mais da metade deles não detectou associação.

Quatro meta-análises foram publicadas com este polimorfismo, e duas delas encontram uma associação positiva, porém de efeito pequeno: OR= 1.13 (Faraone e cols., 2005), e OR= 1.17 (Yang e cols., 2007). Enquanto os outros dois estudos não detectaram associação (Purper-Ouakil e cols., 2005; Li e cols., 2006).

Os estudos com o VNTR da região 3' do gene DAT1 analisados na sua totalidade se mostram bastante divergentes. Existem duas linhas principais para explicar estas inconsistências. A primeira seria que este polimorfismo está em desequilíbrio de ligação com algum outro polimorfismo funcional e que os resultados poderiam estar refletindo um desequilíbrio de ligação variável com este sítio. A segunda seria de que existe uma combinação de variantes funcionais ao longo do gene e ainda que esta combinação possa diferir entre populações distintas.

A maioria dos trabalhos descritos na literatura opta pela primeira linha de explicação sugerindo algum sítio funcional em desequilíbrio de ligação com o VNTR possa explicar os resultados divergentes. Por este motivo, juntamente com a recente identificação de muitos SNPs no gene DAT1 os estudos de associação começaram a incluir outros polimorfismos além deste VNTR.

Barr e cols. (2001) analisaram este VNTR de 40pb da região 3' e mais dois polimorfismos de sítio de restrição no íntron 9 e no éxon 9 do loco DAT1. Estes autores verificaram associação apenas com o VNTR (alelo 10R). A análise dos haplótipos mostrou associação com um deles que continha o alelo 10R. Hawi e cols. (2003) analisaram além do VNTR citado, dois polimorfismos na região codificadora (éxon 9 e 15) e três polimorfismos na região flaqueadora do gene (um na região 5' e dois na região 3'). Neste estudo foi replicada a associação do VNTR da região 3' com o TDAH. Também foi detectada, uma transmissão preferencial, através do HRR, do alelo 3 (marcador da região 5': D5S1981) e do alelo 2 (marcador da região 3' do gene: DS52005) para os probandos. Analisando os haplótipos, os autores encontraram quatro combinações associadas ao TDAH, todas continham o alelo 10R do VNTR com alguma combinação dos polimorfismos flaqueadores. Galili-Weisstub e cols. (2005) analisaram o mesmo VNTR e um SNP "upstream" (2319G/A) no éxon 15, encontrando

associação com os dois marcadores através de um método de associação baseado em família. A análise dos haplótipos mostrou que a associação se tornou mais forte, o que também foi observado nos trabalhos de Barr e cols. (2001) e Hawi e cols.(2003). Já Feng e cols. (2005) também testaram em uma amostra de famílias a associação da região 3' com o TDAH. Ao contrário do trabalho de Galili-Weisstub e cols. (2005) eles não detectaram associação com o 3' VNTR, porém detectaram com 2 SNPs na região 3', mostrando que a região 3' parece importante, mas que o VNTR não estaria contribuindo com a associação. Estes resultados, em conjunto, corroboram a hipótese de que a inconsistência dos trabalhos de associação do VNTR da região 3' com TDAH podem estar refletindo um desequilíbrio de ligação variável com alguma região funcional próxima.

A segunda linha de interpretação para os resultados com o VNTR, que não necessariamente exclui a primeira, seria que existe uma combinação de variantes ao longo do gene que estariam contribuindo para o fenótipo. Recentemente os trabalhos com o VNTR da região 3' tem incluído um outro VNTR no íntron 8 do gene. Brookes e cols. (2006a) identificaram um haplótipo composto pelo alelo de 10 repetições do VNTR na região 3' e o alelo de 6 repetições do íntron 8 associado com o TDAH. Mais dois estudos confirmaram esta associação sugerindo que a combinação destas duas variantes é que seriam importantes no fenótipo da doença (Brookes e cols., 2006b; Asherson e cols., 2007), embora Bakker e cols. (2005) não tenham replicado este achado.

Apesar do grande número de estudos com o VNTR do DAT1, apenas dois estudos com TDAH analisaram o gene como um todo. Brookes e cols. (2006b) analisaram 32 polimorfismos ao longo do gene em uma amostra de 776 famílias com crianças com TDAH do tipo combinado. Eles confirmaram o padrão segmentado do gene previamente descrito em uma amostra de transtorno bipolar, e encontraram quatro blocos haplotípicos. Estes autores identificaram 6 polimorfismos associados ao TDAH, dois na região 3' (rs40184 e rs1042098) e quatro na região 5' (rs2550948, rs2550946, rs11564750 e rs2652511). Neste mesmo trabalho, não detectou-se associação com o VNTR da região 3' isoladamente. A associação só foi evidenciada quando este polimorfismo foi analisado em conjunto com o VNTR do íntron 8, onde foi

detectada uma transmissão preferencial do haplótipo com os alelos de 10 e 6 repetições. Friedel e cols. (2007) também fizeram uma varredura no gene, analisando 30 polimorfismos numa amostra alemã em famílias com filhos com TDAH. Eles encontraram uma estrutura de DL similar à descrita por Brookes e cols. (2006b) com três blocos haplotípicos. Neste trabalho, cinco SNPs foram associados ao TDAH: Na região promotora (rs3756450), no íntron 1 (rs1316830), no éxon 2 (rs6350), no íntron 2 (rs403636), e no íntron 4 (rs463379). Estes dois trabalhos que incluíram variantes ao longo do gene mostraram resultados interessantes. Primeiro, eles identificaram regiões além do VNTR da região 3' que parecem ser importantes para a doença. Segundo, as duas investigações implicaram a região promotora do DAT1 na genética do TDAH. E por último, com exceção da região promotora, eles mostraram regiões diferentes associadas ao TDAH. Concluindo, estes resultados sugerem que as divergências em relação aos resultados com o gene DAT1 poderiam ser explicadas pela complexidade da sua estrutura. Poderiam existir variantes de suscetibilidade comuns a várias populações, bem como regiões específicas para cada população.

Embora os estudos que relacionam o DAT ao TDAH ainda apresentem resultados divergentes, existem indícios suficientes para sugerir que tanto a região 3' como a 5' estão envolvidas no transtorno. Cabe salientar que estas também foram as regiões apontadas pelos estudos de expressão como responsáveis por alguma alteração funcional. Os motivos pelos quais os resultados com TDAH são divergentes provavelmente estão relacionados com a estrutura complexa do gene e seu padrão de desequilíbrio de ligação. Sklar (2005) revisando potenciais aplicações do mapeamento haplotípico no TDAH, salienta que a estrutura do desequilíbrio de ligação é mais complexa do que se imaginava. Não dependendo somente da idade das novas mutações e da distância física dos alelos, mas também de fatores evolutivos, como estrutura genética da população, seleção, efeito do fundador e deriva genética. Considerando que a maioria dos estudos de associação com o TDAH provém de populações diferentes poderia se esperar uma estrutura no desequilíbrio de ligação também diferente. A autora conclui que os estudos de associação com genes candidatos ainda são uma ferramenta importante na investigação de doenças complexas. No entanto, a tendência é a análise completa do gene e não mais um ou



poucos SNPs. Assim será possível determinar a arquitetura população-específica do desequilíbrio de ligação e selecionar SNPs mais informativos e eficientes para estudos de associação.

**Tabela 3:** Estudos de associação do VNTR de 40 pb da região 3' UTR do gene DAT com o TDAH.

<b>Referência</b>	<b>País</b>	<b>Estatística*</b>	<b>n</b>	<b>Resultado**</b>
Gill e cols. (1997)	Irlanda	HRR	40	Positivo
Waldman e cols. (1998)	EUA	TDT	117	Positivo
Daly e cols.(1999)	Irlanda	HRR/TDT	118	Positivo
Palmer e cols. (1999)	EUA	TDT	124	Negativo
Holmes e cols. (2000)	EUA	CC/TDT	137 casos/440 controles 58 famílias	Negativo
Swanson e cols. (2000)	Canadá	HRR/TDT	80	Negativo
Barr e cols. (2001)	Canadá	TDT	102	Negativo
Roman e cols. (2001)	Brasil	CC/HRR	81 casos/100 controles 81 famílias	Negativo
Rowe e cols. (2001)	EUA	CC	80 casos/ 93 controles	Positivo
Todd e cols. (2001)	EUA	TDT	523	Negativo
Smith e cols. (2003)	EUA	CC	158 casos/ 81 controles	Negativo
Chen e cols. (2003)	Taiwan	HRR/TDT	104 famílias	Positivo
Hawi e cols. (2003)	Irlanda	HRR	118 famílias	Positivo
Langley e cols. (2005)	Reino Unido	FBAT/CC	263 famílias 263 casos/ 287 controles	Negativo
Feng e cols. (2005)	Canadá	TDT	178 famílias	Negativo
Galili-Weisstub e cols. (2005)	Israel	ETDT	76 famílias	Positivo
Simsek e cols. (2006)	Omani	CC	92 casos/ 110controles	Negativo
Lim e cols. (2006)	Coréia	TDT	33 famílias	Positivo
Das e Mukhopadhyay (2007)	Índia	TDT/HRR	79 famílias	Negativo
Johansson e cols. (2007)	Noruega	CC	358 casos/ 340 controles	Negativo
Wohl e cols. (2008)	França	TDT	146 famílias	Negativo

\* CC= estudos de associação caso-controle, HRR= risco relativo de haplótipos, TDT= teste de desequilíbrio de transmissão.

\*\* Positivo:  $p < 0.05$ ; negativo:  $p > 0.05$ ;

### 1.5.3 Endofenótipos

Tendo em vista a grande heterogeneidade do TDAH e os resultados inconsistentes dos genes candidatos, a utilização de endofenótipos vem sendo sugerida por alguns autores no intuito de diminuir a complexidade do fenótipo nos estudos genéticos. No entanto, a terminologia endofenótipo tem sido aplicada de muitas maneiras, e parece não existir um consenso para definição exata deste conceito. A maioria das definições refere-se a um fenótipo mais próximo a etiologia biológica do que a doença clínica. Ele deve ser menos complexo geneticamente do que a doença em si, e por este motivo, teoricamente, ele teria mais poder estatístico para detectar um efeito pequeno de um gene individual (Doyle e cols. 2005).

Alguns endofenótipos sugeridos para o TDAH são os subtipos clínicos da doença, escore dos sintomas, presença de comorbidades, testes neuropsicológicos que estimam funções executivas ou intelectuais. Especificamente para o gene DAT, estudos de neuroimagem que avaliem a densidade da proteína no cérebro também podem ser considerados. Mill e cols. (2006) mostraram uma associação dos genes DAT1 e DRD4 com a variação nos níveis de quociente de inteligência (QI) de crianças com TDAH. Considerando que as crianças com TDAH apresentam considerável variação no que diz respeito ao funcionamento intelectual, os autores sugerem que esta variabilidade dentro do TDAH seja mediada por estes genes.

---

**Capítulo II**  
**JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS**

---

O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade exerce um grande impacto na nossa sociedade, uma vez que apresenta alta prevalência, prejuízo significativo na vida dos pacientes e familiares, e conseqüente alto custo financeiro. Além disso, o TDAH está entre os transtornos com maior componente genético da psiquiatria. Tendo em vista o forte componente genético da doença e seu grande impacto na sociedade, é de grande importância procurar investigar os genes de suscetibilidade envolvidos na sua etiologia.

Embora o TDAH venha sendo foco de muitos estudos moleculares nos últimos dez anos, os estudos realizados até hoje não foram suficientes para entender a base genética do transtorno nem esclarecer quais os genes envolvidos e o papel de cada um deles no fenótipo da doença.

Existem indícios suficientes mostrando que o gene do transportador de dopamina (DAT1) é um gene central no TDAH. Apesar de intensamente investigado, os estudos relativos a este gene ainda apresentam resultados divergentes. Atualmente, parece consenso que ele tem um papel na genética do TDAH, porém ainda não está claro de que maneira ele exerce este papel. Cabe salientar que qualquer que seja a linha de explicação para os resultados divergentes do DAT1, se torna necessário entender a estrutura do desequilíbrio de ligação do gene em cada população estudada no intuito de melhor compreender e interpretar os resultados. Pois só analisando o gene como um todo, podemos avaliar com propriedade os resultados identificando quais regiões são importantes e se a estrutura do gene pode explicar os resultados divergentes. É importante notar que esta abordagem é a única que permite testar a hipótese de heterogeneidade alélica, visto que testando um único polimorfismo e sempre o mesmo, não seria possível identificar regiões de suscetibilidade que diferissem entre populações.

Torna-se, portanto, fundamental analisar o gene como um todo, visando caracterizar a estrutura do desequilíbrio de ligação na nossa população, e verificar quais variantes estão associadas ao TDAH estreitando uma possível região funcional relevante pra o transtorno. Esta informação genética pode além de nos ajudar a compreender a etiologia do transtorno, implicar em melhorias no tratamento e estratégias de prevenção mais eficazes.

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Analisar polimorfismos ao longo do gene DAT1, estimando o grau do desequilíbrio de ligação pra cada par de SNPs, para caracterizar a estrutura do gene.
- Verificar se estes polimorfismos individualmente apresentam transmissão preferencial de algum alelo dos pais para os filhos afetados.
- Derivar os haplótipos de cada bloco de marcadores separadamente e verificar se existe uma transmissão preferencial de alguma combinação haplotípica dos pais para os probandos.
- Verificar se o polimorfismo VNTR da região 3' do gene DAT1 juntamente com o polimorfismo VNTR do éxon 3 do gene DRD4 explica a variabilidade nos níveis de QI em pacientes com TDAH.

---

Capítulo III

**A PROMOTER POLYMORPHISM (- 839 C>T) AT THE DOPAMINE TRANSPORTER  
GENE IS ASSOCIATED WITH ATTENTION DEFICIT/HYPERACTIVITY DISORDER  
IN BRAZILIAN CHILDREN**

**American Journal of Medical Genetics Genetics Part B:  
Neuropsychiatric Genetics 144: 215–219 (2007)**

---

## A Promoter Polymorphism (–839 C>T) at the Dopamine Transporter Gene Is Associated With Attention Deficit/Hyperactivity Disorder in Brazilian Children

Júlia P. Genro,<sup>1</sup> Cristian Zeni,<sup>2</sup> Guilherme V. Polanczyk,<sup>2</sup> Tatiana Roman,<sup>3</sup> Luis A. Rohde,<sup>2</sup> and Mara H. Hutz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup>Departamento de Ciências Morfológicas, Fundação Federal Faculdade de Ciências Médicas, Porto Alegre, Brazil

The dopamine transporter (DAT) plays a key role in the regulation of dopaminergic neurotransmission and is also the major site of action for methylphenidate which is one of the main drugs used to treat attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). Most association studies with ADHD have concentrated on the 3'-untranslated region of the gene (3'-UTR) mainly in a variable number of tandem repeat (VNTR) polymorphism, but these investigations have reported discordant results. In this study, we tested this VNTR polymorphism and an additional promoter polymorphism –839 C>T (Rs: 2652511) using family-based association analyses in a sample of 243 Brazilian ADHD children and adolescents and their parents. No significant linkage disequilibrium between the two polymorphisms was detected in this sample ( $D' = 0.56$ ;  $P = 0.22$ ). No evidence of association with the VNTR polymorphism was found. A significant association ( $P = 0.03$ ) for biased transmission of the C allele at the –839 C>T polymorphism to ADHD children in the total sample was observed, which was strengthened when the analyses were restricted to the ADHD combined type ( $P = 0.004$ ). Our results suggest a role for the promoter region of DAT1 gene in ADHD susceptibility in this Brazilian sample. © 2006 Wiley-Liss, Inc.

**KEY WORDS:** ADHD; DAT1; SLC6A3; dopamine transporter

Please cite this article as follows: Genro JP, Zeni C, Polanczyk GV, Roman T, Rohde LA, Hutz MH. 2007. A Promoter Polymorphism (–839 C>T) at the Dopamine Transporter Gene is Associated With Attention Deficit/Hyperactivity Disorder in Brazilian Children. *Am J Med Genet Part B* 144B:215–219.

### INTRODUCTION

Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) is one of the most prevalent and heritable psychiatric disorders of

childhood, affecting 8–12% of children worldwide [Faraone et al., 2003]. It is a very heterogeneous disorder characterized by symptoms of inattention, hyperactivity, and impulsivity with serious consequences on psychosocial function in children and adults. The role of genetic factors in its etiology is strongly supported by family, adoption, and twin studies [Faraone et al., 2005].

Dopamine (DA) exerts important effects on locomotion, motivation, and cognition [Bannon et al., 2004]. Disturbances in its transmission have long been implicated in ADHD pathophysiology. The dopamine transporter (DAT) plays a key role in the regulation of dopaminergic neurotransmission by mediating the active reuptake of synaptic DA. DAT is also the major site of action for methylphenidate. This is the most used stimulant in ADHD treatment, which inhibits the DAT increasing extracellular DA by preventing the recapture of DA release [Bannon, 2005]. This makes the dopamine transporter locus (DAT1 or SLC6A3), a primary candidate gene to examine in ADHD [Roman et al., 2004].

The gene encoding DAT protein has been cloned and located on chromosome 5p15.3 [Vandenbergh et al., 1992]. Despite this gene being highly polymorphic [Mazei-Robison et al., 2005; Greenwood et al., 2006] most association studies have concentrated on the 3'-untranslated region of the gene (3'-UTR) mainly in a variable number of tandem repeat (VNTR) polymorphism. Cook et al. [1995] was the first who demonstrated an association between the 10 repeat allele of this VNTR and ADHD, a finding that has been replicated in several studies [Gill et al., 1997; Waldman et al., 1998; Daly et al., 1999; Rowe et al., 2001; Chen et al., 2003; Hawi et al., 2003; Galili-Weisstub et al., 2005]. However, around half of the investigations of this VNTR in ADHD have found no support for the association [Palmer et al., 1999; Holmes et al., 2000; Swanson et al., 2000; Todd et al., 2001; Smith et al., 2003; Feng et al., 2005; Langley et al., 2005; Hebebrand et al., 2006], including our own previous study [Roman et al., 2001]. A recent pooled analysis of association-based studies reveals a significant but very small effect of the VNTR on ADHD, with an odd pooled ratio of 1.13 [Faraone et al., 2005]. Some studies have demonstrated that variation of length or of sequence in the 3'-UTR of the DAT gene might affect the level of DAT protein [Heinz et al., 2000; Jacobsen et al., 2000] and/or gene expression [Fuke et al., 2001; Michelhaugh et al., 2001; Mill et al., 2002; Miller and Madras, 2002], but not all [Martinez et al., 2001; Lynch et al., 2003]. Because particular alleles of the DAT gene might differentially contribute to altered levels of DAT protein, it is important to further define and analyze the function of other SNPs and haplotypes, and to recognize that the functional consequence of a particular polymorphism is context dependent. It is possible that the number of repeats is not directly involved, but it might be in linkage disequilibrium with a mutation or another polymorphism functionally

\*Correspondence to: Prof. Mara H. Hutz, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: mara.hutz@ufrgs.br

Received 24 April 2006; Accepted 2 August 2006

DOI 10.1002/ajmg.b.30428



important to the ADHD phenotype. In addition, it may have other DNA changes across the gene that in combination with the VNTR, or not, have an influence on DAT1 functionality. Several reports have suggested that the 5'-region may be also important for the variation on gene expression [Greenwood et al., 2001; Greenwood and Kelsoe, 2003; Kelada et al., 2005], although it was much less explored [Langley et al., 2005]. Rubie et al. [2001] reported four polymorphisms in linkage disequilibrium (-67 T>A, -839 C>T, -1169 C>G, -1476 T>G) in the DAT1 promoter region that were potentially related to transcriptional recognition sites, suggesting that they may be functional, and therefore good candidates for association studies between this DAT1 region and disease.

In the current study, we investigated two polymorphisms of the DAT1 gene, the controversial VNTR and a promoter polymorphism -839 C>T (Rs: 2652511) described by Rubie et al. [2001] in a Brazilian sample of families with ADHD probands, in order to start to explore the possible association between DAT1 5'-promoter polymorphisms and ADHD.

#### MATERIALS AND METHODS

Families of children with diagnosed ADHD were recruited from the Child and Adolescent Psychiatric Division of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). A consensus diagnosis of ADHD based on DSM-IV criteria was achieved through a three-stage process, described in detail previously [Roman et al., 2001; Rohde, 2002].

The sample included 243 families comprising 186 parent proband trios and 57 parent-child duos. The first 81 families included in this sample have been previously described by Roman et al. [2001]. The ADHD patients were predominantly males (82.6%), from European descent (92.1%), and their mean age was 10.3 (SD=3.1) years. Most of them presented the combined type (65.6%), and oppositional defiant disorder was the most common comorbid condition (47%). The Ethical Committee of HCPA and the Coordinating Committee of the Graduate Program in Genetics and Molecular Biology of the Federal University of Rio Grande do Sul approved the study protocol. Parents provided written informed consent and probands provided verbal assent to participate.

#### Genotyping

DNA was extracted from whole blood lymphocytes by a salting out procedure as described by Lahiri and Nurnberger [1991]. The 3'-VNTR polymorphism and promoter polymorphism -839 C>T was amplified using the polymerase chain reaction (PCR), with protocols previously described by Roman et al. [2001] and Rubie et al. [2001], respectively.

#### Statistical Analyses

Allele frequencies were estimated by counting. Linkage disequilibrium (D) was estimated using the ARLEQUIN software (version 2.000) [Schneider et al., 2000].  $D_{max}$  (D theoretical maximum) and  $D'$  (the relative magnitude of D as compared to its theoretical maximum, calculated as  $(D/D_{max})$ ) values were calculated as described by Lewontin [1988].

Individual genotype data were analyzed for the complete sample using the statistical package TRANSMIT [Clayton, 1999]. This program tests the association between genetic markers and disease by examining the transmission from parents to affected children. Both trios composed of father, mother, and affected child and parent/proband pairs were included in this analysis. Heterozygotes parent/proband pairs with the same genotype were excluded since the transmission status of parental alleles could not be determined. Haplotype-based associations were also tested using the TRANSMIT program. The association between genetic markers and disease was also analyzed by the transmission disequilibrium test (TDT) and the Fbat statistics using the FBAT software [Laird et al., 2000]. A significance level of 5% was accepted in these comparisons.

#### RESULTS

Six alleles were detected at the DAT1 3'-VNTR in the parents and proband samples, as expected the most common alleles were the 10R (0.70) and 9R (0.27). At the -839 C>T site the frequencies of the C and T allele were 0.56 and 0.44, respectively. Allele frequencies in both markers did not show any significant deviation from those expected according to Hardy-Weinberg equilibrium.

Biased transmissions in both markers analyzed individually in the total sample and in the DSM IV combined subtype group are shown in Table I. A significant association ( $P=0.03$ ) for biased transmission of the C allele at the -839 C>T polymorphism to ADHD children in the total sample was observed, which was strengthened when the analyses were restricted to the combined type only ( $P=0.004$ ). Biased transmission of the C allele for the combined subtype was also observed in the TDT analyses, using only trios with heterozygous parents ( $P=0.03$ ; Table II). Either on the total sample or on the combined one, no allele was significantly more transmitted than expected for the 3'-VNTR polymorphism in the families with ADHD children.

Because the 9R and 10R alleles at the 3'-VNTR account for 97% of the chromosomes investigated, linkage disequilibrium analyses were performed considering the VNTR as a biallelic system. No significant linkage disequilibrium ( $D'=0.56$ ;

TABLE I. Transmit Analyses for the 3'-VNTR and -839 C>T Polymorphism at the DAT1 Locus

Marker	Allele	Allele freq.	Observed	Expected	$\chi^2$	P-value <sup>a</sup>
Total sample						
3'-VNTR <sup>b</sup> (n = 227)	10 repeat	0.71	322	324	3.48	0.78
	9 repeat	0.26	120	118		
-839 C>T (n = 218)	C	0.55	256	196	4.99	0.03
	T	0.45	180	240		
DSM IV combined type sample						
3'-VNTR <sup>b</sup> (n = 146)	10 repeat	0.73	218	214	2.76	0.78
	9 repeat	0.24	68	71		
-839 C>T (n = 140)	C	0.56	174	124	10.18	0.004
	T	0.44	106	156		

n, number of families.

<sup>a</sup>P-values based on 10,000 bootstrap samples.

<sup>b</sup>Only alleles with frequency higher than 5% are showed.

TABLE II. TDT Analyses for the 3'-VNTR and -839C&gt;T Polymorphism at the DAT1 Locus

Marker	Allele	Allele freq.	S	E (S)	Z	P-value
Total sample						
3'-VNTR (n = 119)	10 repeat	0.72	145	148	0.48	0.63
	9 repeat	0.28	93	90		
-839 C>T (n = 134)	C	0.53	151	141	1.51	0.13
	T	0.47	117	127		
DSM IV combined type sample						
3'-VNTR (n = 76)	10 repeat	0.75	100	96	0.81	0.42
	9 repeat	0.25	52	56		
-839 C>T (n = 83)	C	0.55	99	88	2.12	0.03
	T	0.45	67	78		

n, number of informative nuclear families.

$P = 0.22$ ) between the 3'-VNTR and the -839 C>T polymorphism was observed in this sample. No association with haplotypes was observed (data not shown) as expected due to non-significant LD.

### DISCUSSION

Although the results of the present study suggest that the DAT1 gene is associated with ADHD in this sample of Brazilian children with the disorder, the association was not with the 3'-UTR VNTR polymorphism. No preferential transmission of the 10R allele was detected in the analyses performed. This result concurs with our previous study that did not find an association in the first 81 families of this sample [Roman et al., 2001], which suggests that our prior negative association was not due to the low power of our first study. This negative finding for the 3'-VNTR is in agreement with several studies, which considered the polymorphism individually [Palmer et al., 1999; Holmes et al., 2000; Swanson et al., 2000; Todd et al., 2001; Smith et al., 2003; Feng et al., 2005; Langley et al., 2005; Hebebrand et al., 2006]. Since there are several other investigations that have detected an association between the 3'-VNTR polymorphism and ADHD (see above), it is also relevant to consider potential explanations for these inconsistent findings. If the VNTR has an effect in modulating DAT function, the negative results can be due to clinical, genetic, and etiological heterogeneity.

The most probable explanation for these inconsistencies is that the VNTR is in linkage disequilibrium with an adjacent functional variant and the discordant results may reflect variable LD with the functional site. This hypothesis is supported by recent studies that found a stronger association of haplotypes containing the 10R rather than with the 10R allele alone, suggesting that the VNTR might not be the optimum polymorphism to ADHD investigations in all populations [Barr et al., 2001; Hawi et al., 2003; Feng et al., 2005; Galili-Weisstub et al., 2005]. Moreover, these approaches also suggest that the 3'-untranslated region of the DAT1 gene may play a role in gene functionality.

In the present study we described a positive association between a DAT1 promoter polymorphism and ADHD. To the best of our knowledge, only one previous study investigated the association between promoter variants and ADHD. In that study, Langley et al. [2005] did not detect an association with three promoter polymorphisms, mapped more than 1,000 bp upstream of the -839 C>T site investigated herein. If the -839 C>T variant play a functional role, it is possible that these three polymorphisms are not in linkage disequilibrium with it. Rubie et al. [2001] suggested that the -839T allele introduced a leader binding protein-1 (LBP-1) binding site, therefore this 5'-UTR polymorphism may point to differences in transcriptional activation and/or cell-type specific expression of the DAT protein. If a LBP-1 like transcription factor binds around the

-839T allele, and represses its expression, carriers of the -839C allele would have higher DAT1 expression than their counterparts with a T allele. Several studies detected elevated DAT densities in the brain of ADHD patients [Dougherty et al., 1999; Dresel et al., 2000; Krause et al., 2000; Cheon et al., 2003; Madras et al., 2005]. Because the -839 promoter polymorphism alleles might have a differential contribution to altered levels of DAT protein, it is a good candidate to correlate with transporter density in ADHD patients. Nevertheless the functional role of this variant needs to be determined in future investigations.

Preferential transmission of the -839C allele was detected in the total sample ( $P = 0.03$ ), but a stronger association was observed when only patients with the combined subtype were considered ( $P = 0.004$ ). This association with the combined subtype was also observed with the TDT analysis even with a smaller sample size ( $P = 0.03$ ). Waldman et al. [1998] and Todd et al. [2005] suggested that the DAT1 3'-UTR polymorphism gene might influence not only the development of ADHD, but also the severity of the disorder. It is possible that the stronger association with the combined subtype observed herein may be due to a clinically more homogeneous sample or to a yet unknown specific endophenotype restricted to the combined subtype only [Sergeant, 2005].

As pointed out by Waldman and Gizer [2006], the absence of association of a single marker with a disorder in an etiologically relevant gene may not occur simply because it is not in strong LD with the functional etiologically relevant polymorphism in the gene. On the other hand, a positive association between a marker and a disease does not inform how many functional, etiologically relevant polymorphisms are there in the gene. A previous study of markers across the DAT1 gene has identified a segmental pattern of LD with distinct clades in the two flanking regions suggesting the presence of two functionally distinct regions. In addition, these findings also suggest that studies of this gene would best be conducted using haplotypes comprising SNPs derived from each region separately [Greenwood et al., 2002]. The absence of significant LD between the two polymorphisms investigated herein suggests that future haplotype-based studies should consider not only the 3'-UTR region, but also the 5'-flanking region of the gene. It is possible that in some populations, the functional variant is not linked with the common VNTR so far investigated. Several genome-wide scans point to a common risk locus at chromosome 5p13 [Fisher et al., 2002; Bakker et al., 2003; Arcos-Burgos et al., 2004; Ogdie et al., 2006]. In a recent study, Hebebrand et al. [2006] showed evidence of linkage at 5p13 where the DAT1 locus is mapped, but no allelic association of the DAT1 VNTR with ADHD was observed in this German sample. These authors concluded that further studies are required to uncover the genetic variation, that in functional terms validate the chromosome 5p linkage results.

In summary, our current results suggest a role for the promoter region of DAT1 gene in ADHD susceptibility but refute the VNTR as a functional change contributing to the disorder in this Brazilian sample. It is possible that several regulatory elements in the 3'-region, in combination with 5'-region elements, regulate DAT1 expression and contribute to the disease process. Therefore, the focus on the complete gene plus the use of haplotype mapping considering population-specific LD structure in association studies of ADHD should be highly considered as already pointed out [Sklar, 2005]. These investigations could resolve previous discrepancies and restrict potentially functional regions for expression studies.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) for providing financial support to L.A.R. and M.H.H. J.P.G. has a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil).

#### REFERENCES

- Arcos-Burgos M, Castellanos FX, Pineda D, Lopera F, Palacio JD, Palacio LG, Rapoport JL, Berg K, Bailey-Wilson JE, Muenke M. 2004. Attention-deficit/hyperactivity disorder in a population isolate: Linkage to loci at 4q13.2, 5q33.3, 11q22, and 17p11. *Am J Hum Genet* 75:998–1014.
- Bakker SC, van der Meulen EM, Buitelaar JK, Sandkuijl LA, Pauls DL, Monsuur AJ, van't Slot R, Minderaa RB, Gunning WB, Pearson PL, Sinke RJ. 2003. A whole-genome scan in 164 Dutch sib pairs with attention-deficit/hyperactivity disorder: Suggestive evidence for linkage on chromosomes 7p and 15q. *Am J Hum Genet* 72:1251–1260.
- Bannon MJ. 2005. The dopamine transporter: Role in neurotoxicity and human disease. *Toxicol Appl Pharmacol* 204:355–360.
- Bannon MJ, Pruett B, Barfield E, Schmidt CJ. 2004. Transcription factors specifying dopamine phenotype are decreased in cocaine users. *Neuroreport* 15:401–404.
- Barr CL, Xu C, Kroft J, Feng Y, Wigg K, Zai G, Tannock R, Schachar R, Malone M, Roberts W, Nothen MM, Grunhage F, Vandenberg DJ, Uhl G, Sunohara G, King N, Kennedy JL. 2001. Haplotype study of three polymorphisms at the dopamine transporter locus confirm linkage to attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 49:333–339.
- Chen CK, Chen SL, Mil J, Huang YS, Lin SK, Curran S, Purcell S, Sham P, Asherson P. 2003. The dopamine transporter gene is associated with attention deficit hyperactivity disorder in a Taiwanese sample. *Mol Psychiatry* 8:393–396.
- Cheon KA, Ryu YH, Kim YK, Namkoong K, Kim CH, Lee JD. 2003. Dopamine transporter density in the basal ganglia assessed with [123I]IPTSPET in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30:306–311.
- Clayton D. 1999. A generalization of the transmission/disequilibrium test for uncertain haplotype transmission. *Am J Hum Genet* 65:1170–1177.
- Cook EH, Stein MA, Krasowski MD, Cox NJ, Olkon DM, Kieffer JE, Leventhal BL. 1995. Association of attention deficit disorder and the dopamine transporter gene. *Am J Hum Genet* 56:993–998.
- 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.
- Dougherty DD, Bonab AA, Spencer TJ, Rauch SL, Madras BK, Fischman AJ. 1999. Dopamine transporter density in patients with attention deficit hyperactivity disorder. *Lancet* 354:2132–2133.
- Dressel S, Krause J, Krause KH, LaFougere C, Brinkbaumer K, Kung HF, Hahn K, Tatsch K. 2009. Attention deficit hyperactivity disorder: Binding of [99mTc]TRODAT-1 to the dopamine transporter before and after methylphenidate treatment. *Eur J Nucl Med* 27:1518–1524.
- Faraone SV, Sergeant J, Gillberg C, Biederman J. 2003. The worldwide prevalence of ADHD: Is it an American condition? *World Psychiatry* 2:104–113.
- Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE, Smoller JW, Goralnick JJ, Holmgren MA, Sklar P. 2005. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57:1313–1323.
- Feng Y, Wigg KG, Makkar R, Ickowicz A, Pathare T, Tannock R, Roberts W, Malone M, Kennedy JL, Schachar R, Barr CL. 2005. Sequence variation in the 3'-untranslated region of the dopamine transporter gene and attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 139:1–6.
- Fisher SE, Francks C, McCracken JT, McGough JJ, Marlow AJ, MacPhie IL, Newbury DF, Crawford LR, Palmer CG, Woodward JA, Del'Homme M, Cantwell DP, Nelson SF, Monaco AP, Smalley SL. 2002. A genome-wide scan for loci involved in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Hum Genet* 70:1183–1196.
- Fuke S, Sae S, Takahashi N, Koike H, Sasagawa N, Ishiura S. 2001. The VNTR polymorphism of the human dopamine transporter (DAT1) gene affects gene expression. *Pharmacogenomics* 1:152–156.
- Galili-Weisstub E, Levy S, Frisch A, Gross-Tsur V, Michaelovsky E, Kosov A, Meltzer A, Goltser T, Serretti A, Cusin C, Darvasi A, Inbar E, Weizman A, Segman RH. 2005. Dopamine transporter haplotype and attention-deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 10:617–618.
- Gill M, Daly G, Heron S, Hawi Z, Fitzgerald M. 1997. Confirmation of association between attention deficit hyperactivity disorder and a dopamine transporter polymorphism. *Mol Psychiatry* 2:311–313.
- Greenwood TA, Kelsoe JR. 2003. Promoter and intronic variants affect the transcriptional regulation of the human dopamine transporter gene. *Genomics* 82:511–520.
- Greenwood TA, Alexander M, Keck PE, McElroy S, Sadovnick AD, Remick RA, Kelsoe JR. 2001. Evidence for linkage disequilibrium between the dopamine transporter and bipolar disorder. *Am J Med Genet* 105:145–151.
- Greenwood TA, Alexander M, Keck PE, McElroy S, Sadovnick AD, Remick RA, Shaw SH, Kelsoe JR. 2002. Segmental linkage disequilibrium within the dopamine transporter gene. *Mol Psychiatry* 7:165–173.
- Greenwood TA, Schork NJ, Eskin E, Kelsoe JR. 2006. Identification of additional variants within the human dopamine transporter gene provides further evidence for an association with bipolar disorder in two independent samples. *Mol Psychiatry* 11:125–133.
- Hawi Z, Lowe N, Kirley A, Gruenhege F, Nothen M, Greenwood T, Kelsoe J, Fitzgerald M, Gill M. 2003. Linkage disequilibrium mapping at DAT1, DRD5 and DBH narrows the search for ADHD susceptibility alleles at these loci. *Mol Psychiatry* 8:299–308.
- Hebebrand J, Dempfle A, Saar K, Thiele H, Herpertz-Dahlmann B, Linder M, Kiehl H, Remschmidt H, Hemminger U, Warnke A, Knolker U, Heiser P, Friedel S, Hinney A, Schafer H, Nurnberg P, Konrad K. 2006. A genome-wide scan for attention-deficit/hyperactivity disorder in 155 German sib-pairs. *Mol Psychiatry* 11:196–205.
- Heinz A, Goldman D, Jones DW, Palmour R, Hommer D, Gorey JG, Lee KS, Linnola M, Weinberger DR. 2000. Genotype influences in vivo dopamine transporter availability in human striatum. *Neuropsychopharmacology* 22:133–139.
- Holmes J, Payton A, Barrett JH, Hevar T, Fitzpatrick H, Trumper AL, Harrington R, McGuffin P, Owen M, Olier W, Worthington J, Thapar A. 2000. A family-based and case-control association study of the dopamine D4 receptor gene and dopamine transporter gene in attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 5:523–530.
- Jacobsen LK, Staley JK, Zoghbi SS, Seibyl JP, Kosten TR, Imms RB, Gelernter J. 2000. Prediction of dopamine transporter binding availability by genotype: A preliminary report. *Am J Psychiatry* 157:1700–1703.
- Kelada SN, Costa-Mallen P, Checkoway H, Carlson CS, Weller TS, Swanson PD, Franklin GM, Longstreth WT Jr, Afsharinejad Z, Costa LG. 2005. Dopamine transporter (SLC6A3) 5' region haplotypes significantly affect transcriptional activity in vitro but are not associated with Parkinson's disease. *Pharmacogenet Genomics* 15:659–668.
- Krause KH, Dressel SH, Krause J, Kung HF, Tatsch K. 2000. Increased striatal dopamine transporter in adult patients with attention deficit hyperactivity disorder: Effects of methylphenidate as measured by single photon emission computed tomography. *Neurosci Lett* 285:107–110.
- Lahiri DK, Nurnberger JI. 1991. Rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19:5444.
- Laird N, Horvath S, Xu X. 2000. Implementing a unified approach to family based tests of association. *Genet Epidemiol* 19:S36–S42.

- Langley K, Turic D, Peirce TR, Mills S, Van Den Bree MB, Owen MJ, O'donovan MC, Thapar A. 2005. No support for association between the dopamine transporter (DAT1) gene and ADHD. *Am J Med Genet Part B* 139B:7–10.
- Lewontin RC. 1988. On measures of gametic disequilibrium. *Genetics* 120: 849–852.
- Lynch DR, Mozley PD, Sokol S, Maas NM, Balcer LJ, Siderowf AD. 2003. Lack of effect of polymorphisms in dopamine metabolism related genes on imaging of TRODAT-1 in striatum of asymptomatic volunteers and patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* 18:804–812.
- Madras BK, Miller GM, Fischman AJ. 2005. The dopamine transporter and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57:1397–1409.
- Martinez D, Gelernter J, Abi-Dargham A, van Dyck CH, Kegeles L, Imitis RB, Laruelle M. 2001. The variable number of tandem repeats polymorphism of the dopamine transporter gene is not associated with significant change in dopamine transporter phenotype in humans. *Neuropsychopharmacology* 24:553–560.
- Mazei-Robison MS, Couch RS, Shelton RC, Stein MA, Blakeley RD. 2005. Sequence variation in the human dopamine transporter gene in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Neuropharmacology* 49:724–736.
- Michelhaugh SK, Fiskerstrand C, Lovejoy E, Bannan MJ, Quinn JP. 2001. The dopamine transporter gene (SLC6A3) variable number of tandem repeats domain enhances transcription in dopamine neurons. *J Neurochem* 79:1033–1038.
- Mill J, Asherson P, Browes C, D'Souza U, Craig I. 2002. Expression of the dopamine transporter gene is regulated by the 3' UTR VNTR: Evidence from brain and lymphocytes using quantitative RT-PCR. *Am J Med Genet* 114:975–979.
- Miller GM, Madras BK. 2002. Polymorphisms in the 3'-untranslated region of human and monkey dopamine transporter genes affect reporter gene expression. *Mol Psychiatry* 7:44–55.
- Ogdie MN, Bakker SC, Fisher SE, Francks C, Yang MH, Cantor RM, Loo SK, van der Meulen E, Pearson P, Buitelaar J, Monaco A, Nelson SF, Sinke RJ, Smalley SL. 2006. Pooled genome-wide linkage data on 424 ADHD ASPs suggests genetic heterogeneity and a common risk locus at 5p13. *Mol Psychiatry* 11:5–8.
- Palmer CG, Bailey JN, Ramsey C, Cantwell D, Sinsheimer JS, DeHonne M, McGough J, Woodward JA, Asarnow R, Asarnow J, Nelson S, Smalley SL. 1999. No evidence of linkage or linkage disequilibrium between DAT1 and attention deficit hyperactivity disorder in a large sample. *Psychiatr Genet* 9:157–160.
- Rohde LA. 2002. ADHD in a developing country: Are DSM-IV criteria suitable for culturally different populations? *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 41:1131–1133.
- Roman T, Schmitz M, Polanczyk G, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH. 2001. Attention-deficit/hyperactivity disorder: A study of association with both the dopamine transporter gene and the dopamine D4 receptor gene. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)* 105:471–478.
- Roman T, Rohde LA, Hutz MH. 2004. Polymorphisms of the dopamine transporter gene: Influence on response to methylphenidate in attention deficit-hyperactivity disorder. *Am J Pharmacogenomics* 4: 83–92.
- Rowe DC, Stever C, Chase D, Sherman S, Abramowitz A, Waldman ID. 2001. Two dopamine genes related to reports of childhood retrospective inattention and conduct disorder symptoms. *Mol Psychiatry* 6:429–433.
- Rubie C, Schmidt F, Knapp M, Sprandel J, Wiegand C, Meyer J, Jungkunz G, Riederer P, Stober G. 2001. The human dopamine transporter gene: The 5'-flanking region reveals five diallelic polymorphic sites in a Caucasian population sample. *Neurosci Lett* 297:125–128.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L. 2000. Arlequin (ver. 2000). A software for population genetics data analysis. Geneva: Universidade de Geneva.
- Sergeant J. 2005. Are we ready for endophenotypes in attention deficit hyperactivity disorder? *Rev Bras Psiquiatr* 27:262–263.
- Sklar P. 2005. Principles of haplotype mapping and potential applications to attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57:1357–1366.
- Smith KM, Daly M, Fischer M, Yiamoutsos CT, Bauer L, Barkley R, Navia BA. 2003. Association of the dopamine beta hydroxylase gene with attention deficit hyperactivity disorder: Genetic analysis of the Milwaukee longitudinal study. *Am J Med Genet Part B* 119B:77–85.
- Swanson JM, Flodman P, Kennedy J, Spence MA, Moyzis R, Schuck S, Marias M, Moriarty J, Barr C, Smith M, Posner M. 2000. Dopamine genes and ADHD. *Neurosci Biobehav Rev* 24:21–25.
- Todd RD, Jong YJ, Lohs EA, Reich W, Heath AC, Neuman RJ. 2001. No association of the dopamine transporter gene 3' VNTR polymorphism with ADHD subtypes in a population sample of twins. *Am J Med Genet* 105:745–748.
- Todd RD, Huang H, Smalley SL, Nelson SF, Willecutt EG, Pennington BF, Smith SD, Faraone SV, Neuman RJ. 2005. Collaborative analysis of DRD4 and DAT genotypes in population-defined ADHD subtypes. *J Child Psychol Psychiatry* 46:1067–1073.
- Vandenbergh DJ, Persico AM, Hawkins AL, Griffin CA, Li X, Jabs EW, Uhl GR. 1992. Human dopamine transporter gene (DAT1) maps to chromosome 5p15.3 and displays a VNTR. *Genomics* 14:1104–1106.
- Waldman ID, Gizer IR. 2006. The genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Clin Psychol Rev* 26:396–422.
- Waldman ID, Rowe DC, Abramowitz A, Kozel ST, Mohr JH, Sherman SL, Cleveland HH, Sanders ML, Gard JMC, Stever C. 1998. Association and linkage of the dopamine transporter gene (DAT1) and attention-deficit/hyperactivity disorder in children. *Am J Hum Genet* 63:1787–1776.

---

**Capítulo IV**

**A COMMON HAPLOTYPE AT THE DOPAMINE  
TRANSPORTER GENE 5' REGION IS ASSOCIATED WITH  
ATTENTION-DEFICIT/ HYPERACTIVITY DISORDER**

**American Journal of Medical Genetics Part B:  
Neuropsychiatric Genetics (aceito)**

---

**A COMMON HAPLOTYPE AT THE DOPAMINE TRANSPORTER GENE 5' REGION  
IS ASSOCIATED WITH ATTENTION-DEFICIT/ HYPERACTIVITY DISORDER**

Júlia P. Genro<sup>1</sup>, Guilherme V. Polanczyk<sup>2</sup>, Cristian Zeni<sup>2</sup>, Angélica S. Oliveira<sup>1</sup>, Tatiana Roman<sup>1</sup>, Luis A. Rohde<sup>2</sup>, and Mara H. Hutz<sup>1</sup>

1 Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

2 Departamento de Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

**Running title:** 5' DAT1 haplotype association with ADHD.

**Keywords:** DAT1, SLC6A3, promoter region, linkage disequilibrium.

Correspondence to:

Prof. Mara H. Hutz

Departamento de Genética, Instituto de Biociências,  
UFRGS. Caixa Postal 15053, 91501-970- Porto Alegre,  
RS, Brazil.

Phone: 55-51-3308-6720

FAX: 55-51-3308-7311

E-mail: mara.hutz@ufrgs.br

## Abstract

The dopamine transporter (DAT) is the major site of methylphenidate action, which is one of the main drugs used to treat Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD). Most association studies with ADHD focused in a VNTR at the 3'-untranslated region of the gene (3'UTR) presenting conflicting results. However, the most common explanation to inconsistent results is variable linkage disequilibrium with an adjacent functional variant, just a few number of DAT1 studies have reported LD structure across the gene. In this study, we screened 16 polymorphisms across the *DAT1* gene to understand LD structure in a Brazilian sample of families with ADHD probands and to verify if there were evidence for a biased transmission of alleles and haplotypes from parents to their 243 children with ADHD. In the DSM-IV combined subtype, we observed a preferential transmission of the haplotype A/C/C/C/A derived from five SNPs (rs2550948, rs11564750, rs261759, rs2652511, rs2975223) in 5' region ( $p$  corrected=0.018) and no association with any allele/haplotype at the 3' region of the gene, including the 3' VNTR and the VNTR of intron 8. These results suggest a role for the promoter region in ADHD susceptibility and that allele heterogeneity should be highly considered in DAT1 gene association studies highlighting the importance of this gene in the genetics of the disorder.

## Introduction

Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is one of the most prevalent mental health disorders in childhood and adolescence, affecting 5.3% of children worldwide [Polanczyk et al., 2007]. ADHD is a very heterogeneous disorder characterized by symptoms of inattention, hyperactivity and impulsivity determining significant impairment across the life cycle. Although its etiology remains unclear, there is strong evidence supporting the role of genes in the disorder [Faraone et al., 2005].

Multiple lines of evidence suggest dopamine (DA) system dysfunction in the pathogenesis of ADHD [DiMaio et al., 2003]. The dopamine transporter (DAT) is a plasma membrane protein that controls dopaminergic neurotransmission by reuptake of released dopamine into presynaptic neurons. DAT is also the main target for methylphenidate (MPH), the most used stimulant for ADHD treatment. MPH blocks the action of DAT, increasing synaptic dopamine concentrations [Bannon, 2005]. In animal studies, DAT knock-out mice presents a significant increase in motor activity with deficits in learning, memory and social interactions, representing a good animal model for ADHD [Giros et al., 1996; Rodriguiz et al., 2004]. Altogether, these data make the dopamine transporter locus (DAT1 or SLC6A3) a primary candidate gene to examine in ADHD.

The DAT1 gene is mapped on chromosome 5p15.3 [Vandenberg et al., 1992] and consists of 15 exons separated by 14 introns that span more than 52 Kb. The protein-coding portion begins within exon 2 and ends near the beginning of exon 15. This coding sequence presents strong conservation, suggesting that individual differences in DAT expression must arise from regulatory sequences [Bannon et al., 2001].



Recently, several linkage studies have been reported for ADHD. Although there is some overlap in significant linkage peaks, the most consistent is with the distal region of chromosome 5, which was reported in four independent studies [Arcos-Burgos et al., 2004; Bakker et al., 2003; Hebebrand et al., 2006; Ogdie et al., 2004], but not replicated by others [Asherson et al., 2008; Faraone et al., 2008; Romanos et al., 2008]. Ogdie et al. [2006] performed a pooled affected sib pairs (ASP) analysis with two of these previous studies [Bakker et al., 2003; Ogdie et al., 2004], suggesting a common risk locus at 5p13 and genetic heterogeneity between the two studies. These authors proposed that interpopulation variability in linkage signals might reflect differences in underlying susceptibility alleles for ADHD. Because the DAT1 gene is located at the distal end of 5p, it is the most obvious candidate to explain the linkage signal in this region.

Mick and Farone [2008] recently suggested that the lack of replication across linkage studies support the idea that genes with large effects are not related to the etiology of the disorder. Because linkage studies have low power to detect linkage to genes of small effects, the method of association would be more fruitful in the search for ADHD-susceptibility genes.

These findings strongly suggest two key issues: a) there is genetic heterogeneity in ADHD; b) genes for ADHD have a small effect. Therefore, both regions of susceptibility shared between different populations should exist and different populations may have specific susceptibility regions for ADHD. In addition, these regions probably have small effects; therefore, the association approach is still a good strategy to study this complex disease.

Most association studies of the DAT1 gene in ADHD are focused in the 3'-untranslated region of the gene (3'UTR) mainly assessing a variable number of tandem repeat (VNTR) polymorphism. Cook et al. [1995] were the first who demonstrated an association between the 10 repeat allele of this VNTR and ADHD, a finding that has been replicated in several studies

[Chen et al., 2003; Daly et al., 1999; Galili-Weisstub et al., 2005; Gill et al., 1997; Hawi et al., 2003; Lim et al., 2006; Rowe et al., 2001; Waldman et al., 1998]. However, other investigations with this VNTR have found no support for this association [Bakker et al., 2005; Banoei et al., 2008; Brookes et al., 2006a; Feng et al., 2005; Holmes et al., 2000; Langley et al., 2005; Palmer et al., 1999; Simsek et al., 2006; Smith et al., 2003; Swanson et al., 2000; Todd et al., 2001; Wohl et al., 2008], including our own previous study [Genro et al., 2007]. Two pooled analyses of family-based association studies reveal a significant but very small effect of this VNTR on ADHD, with an odd pooled ratio of 1.13 and 1.17 [Faraone et al., 2005; Yang et al., 2007], whilst other two meta-analyses showed no significant association between this polymorphism and the disorder [Li et al., 2006; Purper-Ouakil et al., 2005].

There are two main interpretations to explain these inconsistencies about DAT1 gene results in ADHD: linkage disequilibrium with a functional polymorphism and/or a combination of different functional variants across the gene in diverse populations.

Most investigators preferred the first explanation (i.e, the VNTR is in linkage disequilibrium with an adjacent functional variant and the discordant results may reflect variable LD with the functional site). To test this hypothesis, it would be essential to understand the architecture of linkage disequilibrium for each studied population in an attempt to better choose markers and interpret results.

A few number of DAT1 studies have reported LD structure across the gene. Greenwood et al. [2006] examined 63 variants across the DAT1 in a sample of Bipolar Disorder patients. They observed a LD segmental pattern with three haplotype blocks, suggesting the presence of functionally distinct regions in the gene. Brookes et al. [2006a] screened 32 DAT1 SNPs in 776 combined type ADHD cases and their parents obtained from the IMAGE (International

Multicenter ADHD Gene project) consortium. They confirmed the segmental pattern and defined four haplotype blocks (HB): HB1: promoter-intron2, HB2: intron2-exon8, HB3: intron8-intron13 and HB4: 3'UTR. They also detected six SNPs associated with ADHD located in the 5' (rs2550946, rs550948, rs11564750, rs2652511) and 3'regions of the gene (rs40184, rs1042098), suggesting that the 5' region might also be involved in the etiology of the disorder. Recently, Friedel et al. [2007] genotyped 30 SNPs across the DAT1 gene in a German ADHD sample and found a similar structure with three haplotype blocks: HB1: promoter-intron1, HB2: intron2-intron7 and HB3:exon9-exon15. Although they detected an association with all the three blocks, after Bonferroni correction only block two sustained significance. These authors observed five SNPs associated with ADHD: two located in their block 1 (rs3756450/promoter, rs1316830/intron1) and three in the region that comprises their block 2 (rs6350/exon2, rs403636/intron2, rs463379/intron4). Altogether, these data suggest that other regions in DAT1 gene, besides the 3' UTR, might be implicated in ADHD genetics and that LD structure should be considered for association studies.

The other possible interpretation, which not excludes the first, is that there are more than one causal genetic variant in the etiology of the disorder. The DAT1 expression may be the result of a particular combination of polymorphisms across the gene and this combination may not be the same in different populations. In an attempt to further refine the DAT1 risk variant for ADHD, Brookes et al. [2006b] reported an association with a haplotype that included the 10-repeat allele in the 3' UTR and the 6-repeat allele of a 30-bp VNTR in intron 8. Of the four possible combinations only the 10-6 haplotype was associated with increased risk for ADHD. This finding was replicated by Brookes et al. [2006a] and Asherson et al. [2007]. However,

Bakker et al. [2005] failed to identify an overall association with this haplotype in Dutch probands.

Functional studies have also suggested that the presence of alternative regions is important for DAT1 gene expression. Greenwood and Kelsoe [2003] observed that the promoter region and other intronic regions of DAT1 gene was involved in differential expression, suggesting that many SNPs might contribute with a small effect on gene regulation.

In this study, we screened 16 polymorphisms across the DAT1 gene to understand LD structure in a Brazilian sample of families with ADHD probands. We also used TDT to determine if there were evidence for biased transmission of alleles and haplotypes from the parents to 243 ADHD children in attempt to extend and better interpret our previous association studies [Genro et al., 2007, Roman et al., 2001].

### Materials and methods

Families of children with ADHD were recruited from the Child and Adolescent Psychiatric Division of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). A consensus diagnosis of ADHD based on DSM-IV criteria was achieved through a three-stage process, described in detail previously [Roman et al., 2001]. The sample included 243 families comprising 186 parent proband trios and 57 parent-child duos. The patients with ADHD were predominantly males (82.6%), from European descent (92.1%), and their mean age was 10.3 (SD = 3.1) years. Most of them presented the combined type (65.6%), and oppositional defiant disorder was the most common comorbid condition (47%). The Ethics committee of HCPA and the Coordinating Committee of the Graduate Program in Genetics and Molecular Biology of the Federal

University of Rio Grande do Sul approved the study protocol. Parents provided written informed consent and probands provided verbal assent to participate.

Polymerase chain reaction (PCR) amplification and genotyping of SNPs rs2975226, rs2552511, rs2617596 and the 3'VNTR (rs28363170) were performed as described [Roman et al., 2001; Rubie et al., 2001]. Genotyping of rs11564750 was carried out by PCR in a total volume of 25  $\mu$ l, containing 0.5-1.0  $\mu$ g genomic DNA, 10 pmol of each primer (F: 5' GCAGGTGCATTCTCTGTGTG3' and R: 5'GGATGAGACCCTGTCTCGAA3'), 0.75 U *Taq* polymerase, 200  $\mu$ mol each of four dNTP, 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub> and 2.5  $\mu$ l of PCR buffer. After a initial denaturation at 94 °C, followed by 33 cycles at 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 30 s, and a final extension at 72°C for 5 min, the PCR product were digested at 37°C overnight with *BstN I* endonuclease. The intron 8 VNTR genotyping was performed by PCR with 10 pmol of each primer (F: 5' GCATGTGGATGTGTTCTTGC and R: 5'GCAGAAACAAGGAGGAGCAG) and the same conditions described above except that a temperature of 57°C was used for annealing. All other SNPs were genotyped using the TaqMan SNP Genotyping Assay by demand (Real Time PCR, Applied Biosystems) according to the manufacturer's recommended protocol.

The Haploview program V3.32 was used to estimate linkage disequilibrium (D') as a measure of pairwise LD and to create a graphical representation of LD structure [Barret et al., 2005]. The association between alleles, haplotypes and disease was performed using the transmission disequilibrium tests (TDT) [Spielman et al., 1993]. For this analysis, the FBAT program V1.7.3 was employed [Laird et al., 2000]. Two sided p-values were used and a significance level of 5% was accepted in all comparisons. The Benjamini and Hochberg false discovery rate procedure was performed for multiple testing corrections [Benjamini and Hochberg, 1995]. The POWR

program from PEPI Software Version 4.0 was used to calculate the statistical power of the samples.

## Results

A total of 16 polymorphisms were investigated here to cover a region of 56 Kb in the DAT1 gene, including the 5' promoter region. We selected these variants based on relevance in the literature, minor allele frequency above 10% in previous studies and gene position, to make comparisons with previous described LD structures. The minor allele frequencies (MAF) in the Brazilian population investigated and its position in the DAT1 gene are given in Table I. As in European populations, all markers showed a minor allele frequency (MAF) > 10%, except SNP rs11564750 in which the MAF in Brazilians was 7%. Allele frequencies in all markers did not show any significant deviation from those expected according to Hardy-Weinberg equilibrium.

Linkage disequilibrium ( $D'$ ) between the investigated variants is given in Figure 1. LD blocks were defined based on substantial pairwise LD for the purpose of limiting number of association tests performed. Observation of  $D'$  values indicates that there are three main LD blocks (HB). HB1 covers 4 Kb and includes only the promoter SNPs with strong pairwise LD. HB2 covers a region of 16 Kb and includes the variants of intron 3, 4 and 6. This block also shows very strong LD relationships. HB 3 spans 18 Kb and comprises the region of intron 8 until the 3' VNTR. The third block shows a more complex structure with partial LD in many pairs. The intron2 SNP is not included in these blocks. The three haplotype blocks were not completely independent from each other: the intron 3 SNP in block 2 is in strong LD with exon15 SNP in block 3. The intron3 SNP also showed partial LD with the promoter SNPs in block 1.

Family-based associations for all markers investigated individually in the ADHD sample and in DSM IV ADHD combined subtype group are shown in Table II. No allele was significantly more transmitted than expected to ADHD probands in the total sample. In the DSM IV combined subtype, four promoter SNPs showed biased transmission for ADHD children. The rs2550948 A allele ( $p=0.013$ ), rs2617596 C allele ( $p=0.032$ ), rs2652511 C allele ( $p=0.033$ ), rs2975226 A allele ( $p=0.018$ ). All these significant results were lost after correction for multiple comparisons.

Table III shows the TDT analyses for HB1, HB2, HB3 and the haplotype including only the VNTRs (intron 8 and 3' UTR/exon 15). The promoter haplotype A/C/C/C/A was significantly more transmitted to ADHD probands ( $p=0.025$ ). This association was strengthened when the analyses were restricted to patients with the combined type only ( $p=0.003$ ). After correction for the number of haplotype blocks tested, the association with the promoter haplotype in the combined type subsample remained significant ( $p$  corrected= $0.018$ ). Blocks HB2 and HB3 were not associated with ADHD. The specific haplotype derived from the two VNTRs also was not associated with the disorder.

### Discussion

Although, DAT1 association with ADHD has been extensively examined, only a few studies considered other markers across the entire gene considering LD structure. In this study we investigated 16 polymorphisms across the DAT1 gene and detected a segmental pattern of LD. It is also important to note that this is the first study describing the architecture of LD in a heterogeneous population like Brazilians. The LD structure observed concur with previous results from European or European-derived populations [Brookes et al., 2006a; Greenwood et al.,

2006]. Two reports examined the structure of LD in ADHD samples and also found the same segmental pattern [Brookes et al., 2006a; Friedel et al., 2007]. Although the structure observed here was very similar with these previous studies, we detected some differences in boundaries between blocks. Friedel et al. [2007] detected three haplotype blocks in German families with ADHD. The results observed in Brazilian families have a considerable overlap with the German investigation, but the same SNP at intron 8 (rs27048) showed differences in LD relationships between the two studies. In our study, this SNP was included in block 3 with moderate LD with rs6347/exon9 and strong LD with rs8179029/intron9, whereas in Friedel et al. [2007] study, this intron 8 SNP was not included in any block and showed low LD with rs6347/exon9 and rs8179029/intron9. Brookes et al. [2006a] described a pattern with four blocks. They defined that the end of third block was intron 13, which was not included in our study. It is possible that our third block could also be separated in two.

It has been extensively discussed in the literature [Mick and Faraone, 2008] that associations found between several genes and ADHD are small and they are consistent with the idea that genetic vulnerability to ADHD is mediated by many genes of small effect. This scenario emphasizes the need for candidate gene studies to implement strategies that will provide enough statistical power to detect such small effects. One possible strategy is the examination of refined phenotypes that may reduce heterogeneity, such as ADHD subtypes.

An association with a haplotype derived from the promoter region SNPs in the ADHD combined type sample was observed in the present study. There are consistent explanations for this stronger association with combined ADHD. Todd et al. [2005] suggested that the use of alternative population-based defined ADHD subtypes might help understanding some diverse results presented for candidate gene association studies in ADHD. The identification of natural



clusters of sign and symptoms may represent more etiologically pure forms of the disorder; therefore subtyping approaches might increase the power to find candidate genes. In addition, a recent study [Lubke et al., 2007] proposed that, perhaps, the actual ADHD construct might not be the most appropriate to recognize the disorder. These authors reported that at the population level ADHD may be seen as a single extreme along a continuum in the population, with differences along both dimensions of inattention and hyperactivity-impulsivity. Therefore, studies, including all subtypes may be introducing noise in the analyses.

Our positive results with the DSM-IV ADHD combined subtype are in agreement with those reported by Brookes et al. [2006a] in the IMAGE investigation, which analyzed only patients with this ADHD type and found association with four SNPs in promoter region, three of them also associated here (rs2550948, rs11564750, rs2652511) with the same risk alleles. Therefore the associations found in the present study were a direct replication of results found in the IMAGE sample. Friedel et al. [2007] also found two evidences for a role of the promoter region in ADHD. One promoter SNP (rs3756450) was associated with the disorder and a second one – rs2550956 – could be involved in ADHD linkage to chromosome 5p in their sample.

Kelada et al. [2005] observed that a 5' region haplotype with three of the five SNPs included in our investigation affects transcriptional activity *in vitro*. The biological role of these 5'UTR markers is yet unclear; however they are located in an important region for DAT1 expression. Moreover, Rubie et al. [2001], after *in silico* screening, suggested that the T allele of SNP rs2652511 (-844 C>T) introduce a leader binding protein 1 (LBP-1) binding site. Therefore, this 5'UTR polymorphism may point to differences in transcriptional activation and/or cell-type specific expression of the DAT protein. If a LPB-1 like transcription factor binds around the rs2652511 T allele repressing its expression, carriers of rs2652511 C allele would have higher

DAT1 expression than their counterparts with a T allele. The DAT1 gene exhibits a very high specificity of expression and contains a strong tissue non-specific essential promoter, suggesting a complex combination of positive and negative regulatory factors. In addition, the DAT1 5' flanking region investigated contains multiple recognition sites for several transcription factors [Kouzmenko et al., 1997; Sacchetti et al., 1999]. More recently, Drgon et al. [2006] confirmed that this variant (rs2652511) is associated with higher DAT expression based on two lines of evidences: *In vivo* by PET studies and *post mortem* by saturation radioligand binding studies.

We did not detect evidence of association in the 3' region of the gene. Besides the 3' VNTR, we analyzed two more polymorphisms in this region (rs40184, rs27072) and no preferential transmission for affected children was detected. The specific haplotype derived from the two VNTRs recently reported to be associated with ADHD [Asherson et al., 2007; Brookes et al., 2006a,b] was tested, but no overtransmission of 10-6 haplotype was seen in this Brazilian sample (Table III). We also tested if an intron 4 (RS463379) SNP – reported as the one with the strongest association with ADHD in the German sample [Friedel et al., 2007] – was preferentially transmitted to affected subjects, again with negative results.

Our findings should be understood in the context of some limitations. Our sample is of moderate size, especially for transmission /disequilibrium-based methods. Despite of sample size, our investigation displayed 80% statistical power to detect differences of at least 10% on the frequencies of the risk allele/haplotype. We performed the Benjamini and Hochberg False Discovery Rate procedure for multiple testing corrections. The association of ADHD combined type with the promoter region remains significant. However, when the probability of the type I error (false positive) decreases, the probability of the type II error (false negative) increases.

Since adjustment for multiple testing is not consensual [Perneger, 1998], we show both p-values in tables (corrected and not corrected).

Altogether, our results suggest important conclusions. First, we confirmed that DAT1 gene has a role in ADHD genetics. The strong evidence of linkage in DAT1 region is in agreement with this idea. The promoter region of DAT1 gene seems to be important to ADHD susceptibility. Previous studies that investigated variants in this region found a signal of association [Brookes et al., 2006a; Friedel et al., 2007]. Furthermore, the 5' region is the only responsible for the association between DAT1 and ADHD in Brazilians. The detected role of the promoter region in ADHD susceptibility could partially explain inconsistent results in association studies, even in meta-analyses, given that these studies looked only for association with the 3' VNTR polymorphism. Second, regarding LD structure, it is improbable that the lack of association with the 3' variants could be explained by variable LD with another adjacent polymorphism. In North Europeans, which presented a LD structure similar to that observed in Brazilians, an association with 3' region was described [Brookes et al., 2006a]. Therefore, the differences between findings could not solely be explained by differences in LD architecture. For that reason, the most likely explanation for the inconsistencies regarding the role of the DAT1 gene in ADHD is that a combination of susceptibility variants across the gene exists and these combinations differ between distinct populations. Our results strongly suggest that allele heterogeneity should be highly considered. This allele heterogeneity is commonly seen in several single gene disorders but it is not generally considered in complex phenotypes or in candidate gene analyses. This idea strongly suggest that simply genotyping one marker per gene will provide little (if any) conclusive evidence for association of that gene with the disease.

In summary, our current results suggest a role for the promoter region in ADHD susceptibility. It is possible that the haplotype associated with the disorder here may be implicated with differential expression of DAT1 gene in ADHD. Thus, the focus on the complete gene plus the use of haplotype mapping considering population-specific LD structure in association studies of ADHD may help to better understand and interpret the results in this central gene for ADHD genetics.

#### Acknowledgments

The authors thank financial support provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Institutos do Milênio (CNPq), PRONEX, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil). Conflict of interest: None declared.

## References

Arcos-Burgos M, Castellanos FX, Pineda D, Lopera F, Palacio JD, Palacio LG, Rapoport JL, Berg K, Bailey-Wilson JE, Muenke M. 2004. Attention-deficit/hyperactivity disorder in a population isolate: linkage to loci at 4q13.2, 5q33.3, 11q22, and 17p11. *Am J Hum Genet* 75: 998-1014.

Asherson P, Brookes K, Franke B, Chen W, Gill M, Ebstein RP, Buitelaar J, Banaschewski T, Sonuga-Barke E, Eisenberg J, et al. 2007. Confirmation that a specific haplotype of the dopamine transporter gene is associated with combined-type ADHD. *Am J Psychiatry* 164: 674-677.

Asherson P, Zhou K, Anney RJ, Franke B, Buitelaar J, Ebstein R, Gill M, Altink M, Arnold R, Boer F, et al. 2008. A high-density SNP linkage scan with 142 combined subtype ADHD sib pairs identifies linkage regions on chromosomes 9 and 16. *Mol Psychiatry* 13: 514-521.

Bakker SC, van der Meulen EM, Buitelaar JK, Sandkuijl LA, Pauls DL, Monsuur AJ, van 't Slot R, Minderaa RB, Gunning WB, Pearson PL, et al. 2003. A whole-genome scan in 164 Dutch sib pairs with attention-deficit/hyperactivity disorder: suggestive evidence for linkage on chromosomes 7p and 15q. *Am J Hum Genet* 72: 1251-1260.

*Bakker SC, van der Meulen EM, Oteman N, Schelleman H, Pearson PL, Buitelaar JK, Sinke RJ. 2005. DAT1, DRD4, and DRD5 polymorphisms are not associated with ADHD in Dutch families. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 132: 50-52.*

Banoei MM, Majidizadeh T, Shirazi E, Moghimi N, Ghadiri M, Najmabadi H, Ohadi M. 2008. No association between the DAT1 10-repeat allele and ADHD in the Iranian population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147: 110-111.

Bannon MJ. 2005. The dopamine transporter: role in neurotoxicity and human disease. *Toxicol Appl Pharmacol* 204: 355-360.

Bannon MJ, Michelhaugh SK, Wang J, Sacchetti P. 2001. The human dopamine transporter gene: gene organization, transcriptional regulation, and potential involvement in neuropsychiatric disorders. *Eur Neuropsychopharmacol* 11: 449-455.

Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21: 263–265.

Benjamini Y and Hochberg Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc* 57: 289–300.

Brookes K, Xu X, Chen W, Zhou K, Neale B, Lowe N, Anney R, Franke B, Gill M, Ebstein R, et al. 2006a. The analysis of 51 genes in DSM-IV combined type attention deficit hyperactivity disorder: association signals in DRD4, DAT1 and 16 other genes. *Mol Psychiatry* 11: 934-953.

Brookes KJ, Mill J, Guindalini C, Curran S, Xu X, Knight J, Chen CK, Huang YS, Sethna V, Taylor E, et al. 2006b. A common haplotype of the dopamine transporter gene associated with attention-deficit/hyperactivity disorder and interacting with maternal use of alcohol during pregnancy. *Arch Gen Psychiatry* 63: 74-81.

Chen CK, Chen SL, Mill J, Huang YS, Lin SK, Curran S, Purcell S, Sham P, Asherson P. 2003. The dopamine transporter gene is associated with attention deficit hyperactivity disorder in a Taiwanese sample. *Mol Psychiatry* 8: 393-396.

Cook EH, Stein MA, Krasowski MD, Cox NJ, Olkon DM, Kieffer JE, Leventhal BL. 1995. Association of attention deficit disorder and the dopamine transporter gene. *Am J Hum Gen* 56: 993-998.

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: 27-38.

Drgon T, Lin Z, Wang GJ, Fowler J, Pablo J, Mash DC, Volkow N, Uhl GR. 2006. Common human 5' dopamine transporter (SLC6A3) haplotypes yield varying expression levels in vivo. *Cell Mol Neurobiol* 26: 875-889.

Faraone SV, Doyle AE, Lasky-Su J, Sklar PB, D'Angelo E, Gonzalez-Heydrich J, Kratochvil C, Mick E, Klein K, Rezac AJ, et al. 2008. Linkage analysis of attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. [Epub ahead of print]

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

Feng Y, Wigg KG, Makkar R, Ickowicz A, Pathare T, Tannock R, Roberts W, Malone M, Kennedy JL, Schachar R, Barr CL. 2005. Sequence variation in the 3'-untranslated region of the dopamine transporter gene and attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 139: 1-6.

Friedel S, Saar K, Sauer S, Dempfle A, Walitza S, Renner T, Romanos M, Freitag C, Seitz C, Palmason H, et al. 2007. Association and linkage of allelic variants of the dopamine transporter gene in ADHD. *Mol Psychiatry* 12: 923-933.

Galili-Weisstub E, Levy S, Frisch A, Gross-Tsur V, Michaelovsky E, Kosov A, Meltzer A, Goltser T, Serretti A, Cusin C, et al. 2005. Dopamine transporter haplotype and attention-deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 10: 617-618.

Genro JP, Zeni C, Polanczyk GV, Roman T, Rohde LA, Hutz MH. 2007. A promoter polymorphism (-839 C > T) at the dopamine transporter gene is associated with attention deficit/hyperactivity disorder in Brazilian children. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144: 215-219.

Gill M, Daly G, Heron S, Hawi Z, Fitzgerald M. 1997. Confirmation of association between attention deficit hyperactivity disorder and a dopamine transporter polymorphism. *Mol Psychiatry* 2: 311-313.

Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG. 1996. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 379: 606-612.

Greenwood TA and Kelsoe JR. 2003. Promoter and intronic variants affect the transcriptional regulation of the human dopamine transporter gene. *Genomics* 82: 511-520.

Greenwood TA, Schork NJ, Eskin E, Kelsoe JR. 2006. Identification of additional variants within the human dopamine transporter gene provides further evidence for an association with bipolar disorder in two independent samples. *Mol Psychiatry* 11: 125-133.

Hawi Z, Lowe N, Kirley A, Gruenhege F, Nothen M, Greenwood T, Kelsoe J, Fitzgerald M, Gill M. 2003. Linkage disequilibrium mapping at DAT1, DRD5 and DBH narrows the search for ADHD susceptibility alleles at these loci. *Mol Psychiatry* 8: 299-308.

Hebebrand J, Dempfle A, Saar K, Thiele H, Herpertz-Dahlmann B, Linder M, Kiefl H, Remschmidt H, Hemminger U, Warnke A, et al. 2006. A genome-wide scan for attention-deficit/hyperactivity disorder in 155 German sib-pairs. *Mol Psychiatry* 11: 196-205.

Holmes J, Payton A, Barrett JH, Hever T, Fitzpatrick H, Trumper AL, Harrington R, McGuffin P, Owen M, Ollier W, et al. 2000. A family-based and case-control association study of the



dopamine D4 receptor gene and dopamine transporter gene in attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 5: 523-530.

Kelada SN, Costa-Mallen P, Checkoway H, Carlson CS, Weller TS, Swanson PD, Franklin GM, Longstreth WT Jr, Afsharinejad Z, Costa LG. 2005. Dopamine transporter (SLC6A3) 5' region haplotypes significantly affect transcriptional activity in vitro but are not associated with Parkinson's disease. *Pharmacogenet Genomics* 15: 659-668.

Kouzmenko AP, Pereira AM, Singh BS. 1997. Intronic sequences are involved in neural targeting of human dopamine transporter gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 240: 807-811.

Laird N, Horvath S, Xu X. 2000. Implementing a unified approach to family based tests of association. *Genet Epidemiol* 19: S36-S42.

Langley K, Turic D, Peirce TR, Mills S, Van Den Bree MB, Owen MJ, O'donovan MC, Thapar A. 2005. No support for association between the dopamine transporter (DAT1) gene and ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 139: 7-10.

Li D, Sham PC, Owen MJ, He L. 2006. Meta-analysis shows significant association between dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Hum Mol Genet* 15: 2276-2284.

Lim MH, Kim HW, Paik KC, Cho SC, Yoon DY, Lee HJ. 2006. Association of the DAT1 polymorphism with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): a family-based approach. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141: 309-311.

Lubke GH, Muthén B, Moilanen IK, McGough JJ, Loo SK, Swanson JM, Yang MH, Taanila A, Hurtig T, Järvelin MR, et al. 2007. Subtypes versus severity differences in attention-

deficit/hyperactivity disorder in the Northern Finnish Birth Cohort. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 46: 1584-1593.

Mick E and Faraone SV. 2008. Genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 17: 261-284.

Ogdie MN, Fisher SE, Yang M, Ishii J, Francks C, Loo SK, Cantor RM, McCracken JT, McGough JJ, Smalley SL, et al. 2004. Attention deficit hyperactivity disorder: fine mapping supports linkage to 5p13, 6q12, 16p13, and 17p11. *Am J Hum Genet* 75: 661-668.

Ogdie MN, Bakker SC, Fisher SE, Francks C, Yang MH, Cantor RM, Loo SK, van der Meulen E, Pearson P, Buitelaar J, et al. 2006. Pooled genome-wide linkage data on 424 ADHD ASPs suggests genetic heterogeneity and a common risk locus at 5p13. *Mol Psychiatry* 11: 5-8.

Palmer CG, Bailey JN, Ramsey C, Cantwell D, Sinsheimer JS, Del'Homme M, McGough J, Woodward JA, Asarnow R, Asarnow J, et al. 1999. No evidence of linkage or linkage disequilibrium between DAT1 and attention deficit hyperactivity disorder in a large sample. *Psychiatr Genet* 9: 157-160.

Perneger TV. 1998. What's wrong with Bonferroni adjustments. *B M J* 316: 1236-1238.

Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, Biederman J, Rohde LA. 2007. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry* 164: 942-948.

Purper-Ouakil D, Wohl M, Mouren MC, Verpillat P, Ades J, Gorwood P. 2005. Meta-analysis of family-based association studies between the dopamine transporter gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr Genet* 15: 53-59.

Rodriguez RM, Chu R, Caron MG, Wetsel WC. 2004. Aberrant responses in social interaction of dopamine transporter knockout mice. *Behav Brain Res* 148: 185-198.

Roman T, Schmitz M, Polanczyk G, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH. 2001. Attention-deficit/hyperactivity disorder: A study of association with both the dopamine transporter gene and the dopamine D4 receptor gene. *Am J Med Genet Neuropsychiatr Genet* 105: 471-478.

Romanos M, Freitag C, Jacob C, Craig DW, Dempfle A, Nguyen TT, Halperin R, Walitza S, Renner TJ, Seitz C, et al. 2008. Genome-wide linkage analysis of ADHD using high-density SNP arrays: novel loci at 5q13.1 and 14q12. *Mol Psychiatry* 13: 522-530.

Rowe DC, Stever C, Chase D, Sherman S, Abramowitz A, Waldman, ID. 2001. Two dopamine genes related to reports of childhood retrospective inattention and conduct disorder symptoms. *Mol Psychiatry* 6: 429-433.

Rubie C, Schmidt F, Knapp M, Sprandel J, Wiegand C, Meyer J, Jungkunz G, Riederer P, Stober G. 2001. The human dopamine transporter gene: the 5'-flanking region reveals five diallelic polymorphic sites in a Caucasian population sample. *Neurosci Lett* 297: 125-128.

Sacchetti P, Brownschidle LA, Granneman JG, Bannon MJ. 1999. Characterization of the 5'-flanking region of the human dopamine transporter gene. *Brain Res Mol Brain Res* 74: 167-174.

Simsek M, Al-Sharbati M, Al-Adawi S, Lawatia K. 2006. The VNTR polymorphism in the human dopamine transporter gene: improved detection and absence of association of VNTR alleles with attention-deficit hyperactivity disorder. *Genet Test* 10: 31-34.

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

Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. 1993. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 52: 506-516.

Swanson JM, Flodman P, Kennedy J, Spence MA, Moyzis R, Schuck S, Murias M, Moriarity J, Barr C, Smith M, et al. 2000. Dopamine genes and ADHD. *Neurosci Biobehav Rev* 24: 21-25.

Todd RD, Jong YJ, Lobos EA, Reich W, Heath AC, Neuman RJ. 2001. No association of the dopamine transporter gene 3' VNTR polymorphism with ADHD subtypes in a population sample of twins. *Am J Med Genet* 105: 745-748.

Todd RD, Huang H, Smalley SL, Nelson SF, Willcutt EG, Pennington BF, Smith SD, Faraone SV, Neuman RJ. 2005. Collaborative analysis of DRD4 and DAT genotypes in population-defined ADHD subtypes. *J Child Psychol Psychiatry* 46: 1067-1073.

Vandenbergh DJ, Persico AM, Hawkins AL, Griffin CA, Li X, Jabs EW, Uhl GR. 1992. Human dopamine transporter gene (DAT1) maps to chromosome 5p15.3 and displays a VNTR. *Genomics* 14: 1104-1106.

Waldman ID, Rowe DC, Abramowitz A, Kozel ST, Mohr JH, Sherman SL, Cleveland HH, Sanders ML, Gard JMC, 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.

Wohl M, Boni C, Asch M, Cortese S, Orejarena S, Mouren MC, Gorwood P, Purper-Ouakil D. 2008. Lack of association of the dopamine transporter gene in a French ADHD sample. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. [Epub ahead of print]

Yang B, Chan RC, Jing J, Li T, Sham P, Chen RY. 2007. A meta-analysis of association studies between the 10-repeat allele of a VNTR polymorphism in the 3'-UTR of dopamine transporter

gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144: 541-550.

## Figure legends

Figure 1: DAT1 gene LD structure.

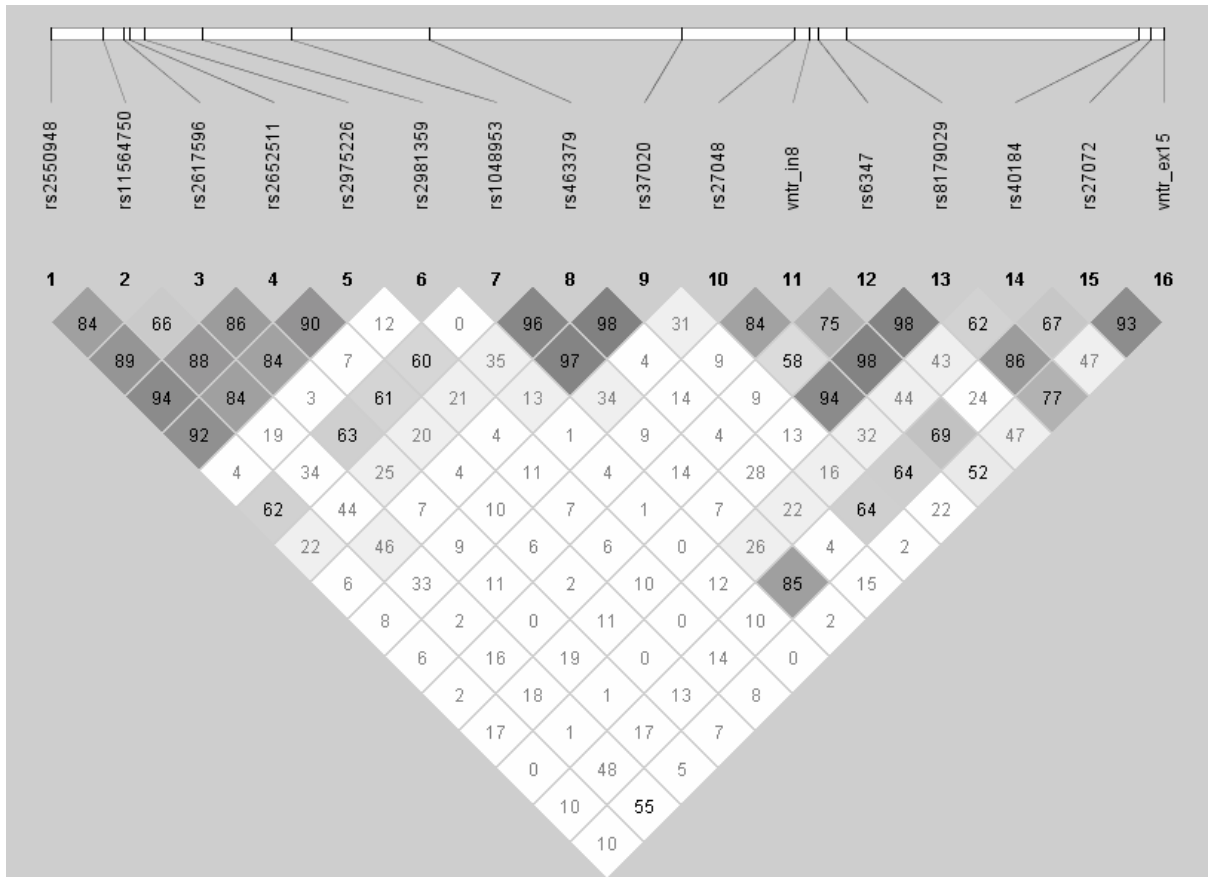


Table I: Investigated SNPs, including position in gene, alleles and MAF (minor allele frequency).

SNP ID	Position in gene	Position reference dSNP	Alleles	MAF (%)
rs2550948	Promoter	1503444	A/G	0.47
rs11564750	Promoter	1500762	C/G	0.07
rs2617596	Promoter	1499719	C/G	0.45
rs2652511	Promoter	1499389	C/T	0.45
rs2975226	Promoter	1498616	A/T	0.45
rs2981359	Intron 2	1495732	C/G	0.49
rs1048953	Intron 3	1491174	C/T	0.32
rs463379	Intron 4	1484164	C/G	0.27
rs37020	Intron 6	1471374	G/T	0.49
rs27048	Intron 8	1465645	C/T	0.42
VNTR	Intron 8	1464855	5/6 repeats	0.27
rs6347	Exon 9	1464412	A/G	0.27
rs8179029	Intron 9	1462985	A/G	0.19
rs40184	Intron 14	1448077	A/G	0.46
rs27072	Exon 15	1447522	C/T	0.19
3' VNTR	Exon 15	1446863	9/10 repeats	0.27

Table II: TDT analysis for 16 variants in DAT1 gene.

SNP ID/Position	Alleles	TOTAL SAMPLE			DSM IV COMBINED SAMPLE			p-value
		N <sup>1</sup>	Observed <sup>2</sup>	Expected <sup>3</sup>	N <sup>a</sup>	Observed <sup>2</sup>	Expected <sup>3</sup>	
rs2550948/promoter	A	125	137	131	78	96	83	0.013
	G		121	127		66	73	
rs11564750/promoter	C	42	67	64	26	40	39	0.715
	G		21	24		14	15	
rs2617596/promoter	C	125	140	132	77	96	85	0.032
	G		118	125		64	75	
rs2652511/promoter	C	129	111	118	79	100	88.5	0.026
	T		114	123		64	75.5	
rs2975226/promoter	A	119	135	127.5	73	91	79	0.018
	T		111	118.5		61	73	
rs2981359/intron2	C	125	138	128	77	84	78	0.248
	G		120	130		76	82	
rs1048953/intron3	C	107	137	135	67	86	89	0.522
	T		83	85		52	49	
rs463379/intron4	C	112	155	149.5	71	98	92	0.185
	G		77	82.5		46	52	
rs37020/intron6	G	118	132	131.5	72	78	82	0.414
	T		112	112.5		68	64	
rs27048/intron8	C	123	123	130	79	78	82.5	0.388
	T		129	122		84	79.5	
VNTR <sup>4</sup> /intron8	5 repeat	104	73	77	67	46	48.5	0.592
	6 repeat	109	147	144	71	94	93.5	0.917
rs6347/exon9	A	99	130	131	62	82	82.5	0.911
	G		74	73		46	45.5	
rs8179029/intron9	A	86	57	57.5	57	36	37	0.811
	G		125	124.5		84	83	
rs40184/intron14	A	122	122	121	74	70	71	0.844
	G		130	131		82	81	
rs27072/exon15	C	93	141	135.5	62	94	91.5	0.563
	T		55	60.5		36	38.5	
3' VNTR <sup>4</sup> /exon15	9 repeat	108	83	82	69	48	51.5	0.458
	10 repeat	115	147	148	74	99	94.5	0.365



<sup>1</sup> Number of informative nuclear families.

<sup>2</sup> Fbat statistic representing the observed number of transmissions.

<sup>3</sup> Expected values of the test statistic under the null hypothesis of no association.

<sup>4</sup> Only alleles with frequency higher than 5% are showed.

Table III: TDT Haplotype Analyses for the three blocks and VNTRs haplotype.

Haplotype	Freq.	N <sup>1</sup>	Transmissions		p-value
			Observed <sup>2</sup>	Expected <sup>3</sup>	
<b>Block 1 [rs2550948/rs11564750/rs261759/rs2652511/rs2975223]</b>					
Total Sample (N <sup>4</sup> = 236)					
A/C/C/C/A	0.496	103.5	150.897	135.607	0.025 <sup>5</sup>
G/C/G/T/T	0.314	97.4	84.449	89.375	0.409
G/G/G/T/T	0.048	30.2	16.897	17.607	0.809
DSM IV-Combined Type Sample (N <sup>4</sup> = 155)					
A/C/C/C/A	0.505	65.0	107.912	91.912	0.003 <sup>6</sup>
G/C/G/T/T	0.312	58.0	45.088	55.088	0.036
G/G/G/T/T	0.054	17.8	9.912	10.912	0.667
<b>Block 2 [rs1048953/rs463379/rs37020]</b>					
Total Sample (N <sup>4</sup> = 236)					
T/C/T	0.316	89.9	93.981	95.452	0.799
C/G/G	0.250	100.9	86.921	90.383	0.535
C/C/G	0.244	87.0	84.060	78.569	0.313
C/C/T	0.182	75.9	61.659	60.976	0.843
DSM IV-Combined Type Sample (N <sup>4</sup> = 155)					
T/C/T	0.289	56.9	60.967	57.435	0.443
C/C/G	0.258	50.0	53.041	51.041	0.636
C/G/G	0.254	63.9	50.926	54.893	0.348
C/C/T	0.188	47.0	38.991	39.024	0.993
<b>Block 3 [rs27048/vntr_in8/rs8179029/rs6347/rs40184/3'vntr_ex15]</b>					
Total Sample (N <sup>4</sup> = 236)					
C/6/G/A/G/C/10	0.263	85.0	95.000	95.500	0.925
C/5/A/G/A/C/9	0.119	61.0	44.641	46.141	0.729
T/6/G/A/A/T/10	0.107	59.0	37.000	39.000	0.650
T/6/G/A/G/C/10	0.095	45.0	38.000	35.983	0.560
T/6/G/A/A/C/10	0.055	31.7	20.641	19.337	0.646
T/6/G/A/A/C/9	0.047	24.0	21.359	17.342	0.114
DSM IV-Combined Type Sample (N <sup>4</sup> = 155)					
C/6/G/A/G/C/10	0.271	53.0	65.000	63.500	0.721
C/5/A/G/A/C/9	0.114	37.0	25.000	26.000	0.768
T/6/G/A/A/T/10	0.103	36.0	23.000	23.000	1.000
T/6/G/A/G/C/10	0.083	26.8	22.000	20.413	0.538
T/6/G/A/A/C/10	0.064	20.2	15.000	14.587	0.857
<b>VNTRs Haplotype [intron 8/3'UTR]</b>					
Total Sample (N <sup>4</sup> = 236)					
6/10	0.616	107.7	159.748	159.748	1.000
5/9	0.161	78.8	55.748	57.428	0.759
6/9	0.091	43.3	33.252	32.252	0.776
5/10	0.090	45.3	32.252	33.752	0.672
DSM IV-Combined Type Sample (N <sup>4</sup> = 155)					

6/10	0.622	67.9	105.841	103.400	0.648
5/9	0.157	50.9	33.841	34.900	0.789
6/9	0.092	33.0	20.159	21.100	0.752
5/10	0.079	24.2	14.159	16.600	0.346

---

<sup>1</sup> Number of informative nuclear families.

<sup>2</sup> Fbat statistic representing the observed number of transmissions.

<sup>3</sup> Expected values of the test statistic under the null hypothesis of no association.

<sup>4</sup> Number of genotyped families.

<sup>5</sup> p corrected = 0.075

<sup>6</sup> p corrected = 0.018

---

**Capítulo V**

**NO ASSOCIATION BETWEEN DOPAMINERGIC  
POLYMORPHISMS AND INTELLIGENCE VARIABILITY IN  
ATTENTION-DEFICIT/HYPERACTIVITY DISORDER**

**Molecular Psychiatry, 11: 1066–1067 (2006)**

---

## No association between dopaminergic polymorphisms and intelligence variability in attention-deficit/hyperactivity disorder

*Molecular Psychiatry* (2006) 11, 1066–1067.  
doi:10.1038/sj.mp.4001900

Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is one of the most common and heritable psychiatric disorders.<sup>1</sup> Although it is characterized by core symptoms (inattention, hyperactivity and impulsivity), there is considerable heterogeneity in clinical features among individuals with ADHD.<sup>2</sup> The use of endophenotypes has been suggested as an alternative approach to decrease this clinical heterogeneity in genetic investigations addressing ADHD.<sup>3,4</sup>

Recently, Mill *et al.*<sup>5</sup> demonstrated an association between the two most investigated polymorphisms in ADHD, the 40bp variable number of tandem repeats (VNTR) at the DAT1 gene and the 48bp VNTR at the DRD4 gene, with intelligence variability among children with ADHD in two independent birth cohorts from Britain and New Zealand. In that study, children with ADHD diagnosis were assessed based on mother and teacher reports using respectively DSM-IV or DSM-III criteria for the Britain and New Zealand cohorts. These investigators defined genetic risk by the presence of at least one DRD4 seven repeat allele and/or by the presence of homozygous 10/10 DAT1 genotype. Children were

scored 0 if they carried no genetic risk, 1 if they carried one genetic risk factor and 2 if they carried both risks. In the British cohort ( $n=171$ ), children with one genetic risk scored 2.6 intelligence quotient (IQ) points lower than children with no genetic risk, and children with both genetic risks scored 8.2 IQ points lower than children with no risk ( $P=0.02$ ). These results were replicated in the New Zealand Cohort ( $n=55$ ) ( $P=0.03$ ). In both samples, the association between number of genotypes at risk and IQ remained significant after controlling for number of symptoms of hyperactivity/impulsivity and inattention.

As it is well-established that replication is an important condition to accept a given hypothesis in psychiatric genetics, we decided to examine the hypothesis proposed by Mill *et al.*<sup>5</sup> in three independent samples of Brazilian subjects with ADHD. The first two samples were composed by 242 referred children with ADHD recruited at the Child and Adolescent Psychiatric Division of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), and 220 adults with ADHD recruited at the adult clinic in the same hospital. An ADHD consensus diagnosis based on DSM-IV criteria was achieved as described in detail previously.<sup>6,7</sup> The third group was a community sample including 100 children with ADHD inattentive type ascertained from 12 public schools. The extensive diagnostic process, also based in DSM-IV criteria, used in this sample have been fully described elsewhere.<sup>8</sup> The estimated IQ score was obtained from the Vocabulary and Block Design subtests of the Wechsler Intelligence Scale – Third Edition (WISC III)<sup>9</sup> for children and from the same sub-tests of the WAIS-R<sup>10</sup> for adults, both administered by trained psychologists. The DRD4 region containing the 48bp repeat and the 40bp VNTR site at DAT1 gene was amplified by the polymerase chain reaction (PCR) as described by Roman *et al.*<sup>6</sup> The IQ scores were compared among groups through analysis of variance in the unadjusted model and

**Table 1** IQ scores for subjects with ADHD defined by the presence or absence of the seven-repeat allele of the DRD4 gene and by the presence or absence of the DAT1 10/10 genotype<sup>a</sup>

Samples	Low-risk genotype	1 genotype risk	DRD4/DAT1 risk	P-value
Children <sup>b</sup> N=242	92.8 (15.0) n=71	93.0 (14.6) n=129	91.2 (13.8) n=42	0.769
Children <sup>c</sup> N=100	94.1 (10.8) n=29	93.9 (10.8) n=49	93.7 (12.4) n=22	0.992
Adults N=220	99.0 (8.0) n=58	101.3 (8.9) n=117	99.2 n=45	0.147

Abbreviations: ADHD, attention-deficit/hyperactivity disorder; IQ, intelligence quotient.

<sup>a</sup>Data are presented as mean (s.d.).

<sup>b</sup>Children ascertained at the hospital.

<sup>c</sup>Children ascertained at public schools.

through analysis of covariance controlling for age, and sex.

No significant association was seen both in the unadjusted model (Table 1) (children with ADHD from the clinical sample:  $P=0.769$ ; ADHD-I community sample:  $P=0.992$ ; sample of adults with ADHD:  $P=0.147$ ), and in the model adjusted for potential confounders ( $P=0.648$ ,  $P=0.907$  and  $P=0.847$ , respectively from children with ADHD from the clinical sample, ADHD-I community sample and adults; data available upon request). Therefore, our results did not replicate previous findings from Mill *et al.*<sup>5</sup> suggesting that DAT1 and DRD4 VNTR polymorphisms did not influence IQ variation in three independent samples of Brazilian subjects with ADHD. Although Mill *et al.*<sup>5</sup> replicated their findings in two independent cohorts, their two ADHD samples were smaller than those investigated in Brazil. Thus, our negative results do not seem to be owing to lack of statistical power to replicate their findings. More important, these negative results suggest that between-study heterogeneity in the association between ADHD and DRD4/DAT1 might not be explained by variability in intellectual ability across subjects with ADHD. The role of these polymorphisms in the neurobiology of ADHD needs to be further investigated.

J.P. Genro<sup>1</sup>, T. Roman<sup>2</sup>, C.P. Zeni<sup>3</sup>, E.H. Grevet<sup>3</sup>,  
M. Schmitz<sup>3</sup>, P.B. de Abreu<sup>3</sup>, C.H.D. Bau<sup>1</sup>,  
L.A. Rohde<sup>3</sup> and M.H. Hutz<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;

<sup>2</sup>Department of Morphological Sciences, Federal School of Medical Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil and

<sup>3</sup>Department of Psychiatry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil  
E-mail: mara.hutz@ufrgs.br

## References

- 1 Faraone SV, Sergeant J, Gillberg C, Biederman J. *World Psychiatry* 2003; 2: 104–113.
- 2 Nigg JT, Willcutt EG, Doyle AE, Sonuga-Barke EJ. *Biol Psychiatry* 2005; 57: 1224–1230.
- 3 Castellanos FX, Tannock R. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3: 617–628.
- 4 Sergeant J. *Rev Bras Psiquiatr* 2005; 27: 262–263.
- 5 Mill J, Caspi A, Williams BS, Craig I, Taylor A, Polo-Tomas M *et al.* *Arch Gen Psychiatry* 2006; 63: 462–469.
- 6 Roman T, Schmitz M, Polanczyk G, Elzirik M, Rohde LA, Hutz MH. *Am J Med Genet* 2001; 105: 471–478.
- 7 Grevet EH, Bau CH, Salgado CA, Fischer AG, Kalil K, Victor MM *et al.* *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2006; 256: 311–319 [E-pub ahead of print].
- 8 Schmitz M, Donardin D, Silva TL, Pianca T, Roman T, Hutz MH *et al.* *Biol Psychiatry* 2006 [E-pub ahead of print], doi:10.1016/j.biopsych.2006.02.035.
- 9 Wechsler D. *Examiner's Manual: Wechsler Adult Intelligence Scale-Revised*. Psychological Corporation: Cleveland, 1981.
- 10 Wechsler D. *Examiner's Manual: Wechsler Intelligence Scale for Children-Third Edition*. Psychological Corporation: New York, 1991.

## Expression of ribosomal subunit genes increased coordinately with postmortem interval in human brain

*Molecular Psychiatry* (2006) 11, 1067–1069.  
doi:10.1038/sj.mp.4001901

It has been well established that postmortem interval (PMI), the time between death and freezing of brain tissue, did not greatly affect the gene expressions.<sup>1–5</sup> In fact, messenger RNA (mRNA) in human brain is relatively stable after death and its integrity was maintained over the long period of time.<sup>1–5</sup> From the data analysis of two independent large sets of DNA microarray experiments, we unexpectedly found that expression of ribosomal subunit genes was consistently increased with PMI, implicating the existence of coordinated gene expression changes with PMI in human brain.

Using DNA microarray data of postmortem human brains (set 1:  $n=102$ ),<sup>6</sup> we systematically assessed the effect of demographic variables including PMI on gene expressions (See Supplementary information for detail). Expression of a total of 1754 out of 22 000 probe sets showed significant correlations with PMI (Pearson's correlation,  $P<0.05$ ), consistent with the previous notion that PMI is a minor confounding factor compared with other factors (Supplementary Figure 1). In contrast to sample pH, which is closely associated with terminal condition of death and a major confounding factor for gene expression studies,<sup>1–5,7,8</sup> PMI did not correlate with indicators of RNA integrity or sample quality (Figure 1a). Together with the fact that PMI did not correlate with sample pH (Supplementary Figure 2), we concluded that PMI did not affect quality of DNA microarray data.

GeneOntology analysis of PMI-correlated probe sets revealed significant over-representation of ribosome-related categories (Figure 1b). Detailed examination of annotations for all the PMI-correlated probe sets revealed that they included 77 probe sets, which corresponded to 54 distinctive ribosomal subunit genes (Supplementary Table 1). They included ribosomal protein components of both small and large subunits, and, strikingly, all of their expressions showed positive correlations with PMI (Figure 1c, for example).

Positive correlation between expression of ribosomal subunit genes and PMI was also clearly found in the other independent data set of DNA microarray experiments (set 2:  $n=50$ )<sup>9</sup> (Supplementary Table 2). In this set, among 1106 PMI-correlated probe sets out of 12 000 probe sets, 59 probe sets corresponding to 56 distinctive ribosomal subunit genes could be identified (Supplementary Table 3). In both sample sets, positive correlation was also observed when we normalized



A discussão aqui apresentada tem como objetivo integrar os resultados obtidos neste trabalho a partir de uma perspectiva mais ampla e geral do assunto. As discussões específicas dos resultados obtidos no presente estudo foram abordadas nos capítulos III, IV e V. Pretendemos, então neste capítulo final, situar o trabalho dentro do contexto da genética psiquiátrica e dos estudos de associação, discutindo seu potencial, suas dificuldades, perspectivas e aplicabilidade.

Grandes avanços já foram realizados no estudo genético de muitas enfermidades. Doenças com herança mendeliana clássica, aquelas que apresentam um único loco responsável pela doença, obtiveram ganhos inestimáveis com o entendimento de sua base genética, tais como fenilcetonúria, hemofilia, entre muitas outras. No entanto o TDAH, assim como as demais doenças psiquiátricas, é uma doença multifatorial de herança complexa. Apesar de ter um componente genético substancial, espera-se que múltiplos fatores genéticos e ambientais estejam determinando o fenótipo. No que diz respeito às doenças complexas existem diferenças importantes quando comparadas às doenças mendelianas simples, e estas diferenças têm conseqüências importantes na maneira de entender e estudar estas doenças. Nas características multifatoriais, existem muitos genes que influenciam o fenótipo e cada um deles, quando considerados isoladamente, conferem um risco muito pequeno para desenvolver a doença. Por conseqüência, para cada gene espera-se tanto uma baixa penetrância quanto uma freqüência relativamente alta na população em geral. Também é provável para traços complexos, a existência de heterogeneidade genética, onde o mesmo genótipo possa resultar em diferentes fenótipos, e diferentes genótipos possam resultar no mesmo fenótipo. Além disso, fatores ambientais geralmente exercem um papel importante nestas doenças, por conseguinte, interações gene-ambiente tornam-se mais um fator a ser considerado no estudo destas doenças.

Além das características inerentes a qualquer doença complexa, que já foram citadas acima, a genética psiquiátrica possui ainda um outro aspecto importante a ser considerado que soma complexidade ao problema, a grande



heterogeneidade destas doenças no que se refere a sua manifestação clínica. O TDAH possui diagnóstico fundamentalmente clínico, e dentro deste conceito são inúmeras as variações possíveis que fecham o mesmo diagnóstico e por consequência o mesmo fenótipo que analisamos nos estudos genéticos. Os subtipos clínicos existentes, por exemplo, já marcam diferenças importantes nos sintomas entre os pacientes nas próprias diretrizes diagnósticas do transtorno. Ainda podemos citar a alta prevalência de comorbidades, a presença de diferentes comorbidades e o curso clínico que tanto pode ser crônico quanto pode apresentar melhora e até remissão total dos sintomas na adolescência e na vida adulta. E por último podemos mencionar o tratamento que apresenta várias abordagens e uma variação considerável na resposta conforme o paciente. O TDAH, portanto é uma doença bastante complexa e heterogênea, conseqüentemente para compreendermos sua genética devemos analisá-lo sob esta perspectiva.

Os estudos moleculares no TDAH utilizam duas abordagens principais, já descritas na introdução desta tese, os estudos de associação e os estudos de ligação. Se analisarmos os resultados em relação à genética do TDAH em uma perspectiva mais ampla alguns avanços importantes podem ser verificados. Entretanto, cabe ressaltar que ainda existem mais controvérsias do que certezas neste campo de investigação.

Os estudos de ligação para o TDAH começaram muito recentemente, e ainda que tenhamos algumas regiões sobrepostas entre as investigações, esse tipo de abordagem parece não ser a ideal para entender a genética do TDAH. Já os estudos de associação que foram primeiramente empregados para entender a base molecular do TDAH, ainda são apontados como mais adequados para este fim, embora, atualmente com alguns refinamentos metodológicos. Em relação a estes estudos com genes candidatos, existem evidências corroborando a importância de alguns genes, como DRD4, DRD5, DAT1, SNAP25, HTR1B na etiologia do TDAH (Mick e Faraone, 2008). Entretanto, os resultados, mesmo para os genes mais sugestivos, ainda são bastante divergentes. Por este motivo, talvez ainda pareça precipitado falar em genes para o TDAH. Se formos analisar os resultados moleculares para o TDAH como um todo, até agora, eles parecem

apontar para um único consenso: que sua genética é complexa mediada por genes de pequeno efeito com uma considerável heterogeneidade genética determinando seu fenótipo.

Atualmente, os trabalhos de associação vêm buscando alternativas para explicar as inconsistências, em uma tentativa de acessar e minimizar os diferentes níveis de complexidade do problema. A primeira alternativa seria a abordagem dos endofenótipos para simplificar o fenótipo em si. Outra alternativa seria abordar a complexidade das interações gene-gene e gene-ambiente. Ainda uma outra opção seria considerar a complexidade no nível da estrutura genética através de uma análise mais detalhada dos genes importantes.

A heterogeneidade do fenótipo é umas das explicações possíveis para as inconsistências dos resultados de associação. O refinamento dos fenótipos se apresenta como alternativa no intuito de analisar grupos genéticos mais homogêneos. A análise dos subtipos clínicos do TDAH, por exemplo, vem sendo utilizada em estudos recentes (Brookes e cols., 2006b). Traços quantitativos como escore de sintomas, e qualitativos como a presença de comorbidades e/ou a persistência da doença na idade adulta já foram sugeridos para minimizar a complexidade do fenótipo (Asherson e cols., 2004, Thapar e cols., 2006). Medidas neuropsicológicas como testes que avaliam funções executivas, e medidas de neuroimagem como dados volumétricos do cérebro também vêm sendo sugeridos como endofenótipos para o TDAH. No entanto, é importante ressaltar que para considerarmos estas medidas úteis como endofenótipos, elas têm que apresentar evidências de herdabilidade e sobreposição com os estudos de famílias. Do contrário, podemos identificar genes para um fenótipo válido biologicamente, mas estes genes podem não estar relacionados à doença de interesse.

A influência das interações gene-gene e gene-ambiente também poderiam ajudar a entender as divergências nos estudos de associação com TDAH. É possível que exista uma combinação do efeito de mais de um gene no fenótipo em questão. Alguns trabalhos já foram descritos na literatura analisando esta conjuntura, principalmente em relação à interação entre o gene DAT1 e o gene DRD4. Além disto, sabendo que fatores ambientais são também importantes na

etiologia da doença, supõe-se que estes fatores possam atuar como gatilhos na suscetibilidade genética ao TDAH. As variáveis genéticas que influenciam o TDAH podem aumentar o risco para o transtorno somente em um determinado ambiente. Este tipo de interação foi sugerido em um trabalho muito interessante com o gene MAOA onde crianças que tinham a variante de baixa atividade da enzima e sofriam maus tratos tinham um risco aumentado de desenvolver transtornos de conduta (Caspi e cols., 2002). Em relação ao TDAH é amplamente aceito na literatura que fatores ambientais que ocorrem no período pré-natal, tais como uso de cigarro e álcool pela mãe, estão associados com a doença. Exposição ao fumo pré-natal já foi associado com o VNTR da região 3' do gene DAT1 tanto para os subtipos clínicos do TDAH (Neuman e cols., 2007) quanto para os sintomas de hiperatividade-impulsividade (Becker e cols., 2008). Interação do haplótipo formado pelos dois VNTRs do gene DAT1 (3' VNTR e VNTR do íntron 8) com exposição ao álcool pré-natal também já foi descrita na literatura (Brookes e cols., 2006a). Assim como cigarro e o álcool, adversidades sociais também são importantes no desenvolvimento da doença. Um estudo recente mostrou uma interação positiva entre os VNTRs do gene DAT1 (3' VNTR e VNTR do íntron 8) e condições psicossociais adversas (Laucht e cols., 2007).

Além da heterogeneidade do fenótipo do TDAH, e da complexidade das interações possíveis, os estudos estão cada vez mais indicando que sua arquitetura genética também é complexa. Portanto, entender esta estrutura nas diferentes populações é mais uma opção na tentativa de explicar as inconsistências nos estudos moleculares do TDAH. Decorrente disto uma mudança importante na literatura de uma abordagem de uma única variante por gene para muitas variantes por gene pode ser observada. Até bem pouco tempo atrás a grande maioria dos estudos focava em apenas um polimorfismo e geralmente a mesma variante para cada gene era sistematicamente triada em diferentes populações em busca de uma possível replicação.

A abordagem escolhida neste estudo foi justamente focar o gene DAT1 com mais detalhamento. Este gene exemplifica bem a problemática dos estudos de associação. Apesar de ser o gene mais estudado e com mais evidências de

exercer um papel no TDAH, ainda apresenta resultados bastante contraditórios. Mesmo sendo um gene importante, a grande maioria dos estudos focou-se no VNTR da região 3'. Observamos, então, a inclusão de mais alguns poucos polimorfismos nos estudos a partir do ano 2000, e agora bem recentemente, dois trabalhos analisaram polimorfismos ao longo de todo o gene (Brookes e cols. 2006; Friedel e cols. 2007). Nosso trabalho dentro deste contexto se propôs exatamente a entender a estrutura do gene DAT1 na nossa população em relação à suscetibilidade genética ao TDAH. Cabe ressaltar aqui que não escolhemos esta abordagem por acreditar que a complexidade genética é o nível mais importante a ser analisado, mas sim, porque nos parece que ele tem que ser o primeiro nível a ser analisado. Os estudos de associação acabavam sempre evocando o termo desequilíbrio de ligação para explicar resultados positivos ou negativos. Analisando o gene como um todo, e entendendo a estrutura do seu desequilíbrio de ligação podemos, ao menos, discutir os resultados com base em evidências não em especulações. Para um gene grande e complexo como o DAT1, primeiro é necessário identificar quais são as variáveis importantes, como é a estrutura do desequilíbrio de ligação neste gene para então analisar com mais clareza as demais interações. Além disso, outro aspecto que também poderia explicar as divergências é a presença de heterogeneidade genética/alélica na etiologia do TDAH. Apesar de ser um fenômeno esperado em doenças complexas, este assunto nunca foi muito discutido nos estudos moleculares do TDAH. Tanto podemos ter diferentes genes de suscetibilidade, como diferentes alelos no mesmo gene para diferentes populações. Nesse contexto, os nossos objetivos em um primeiro momento foram entender a estrutura de desequilíbrio de ligação do gene DAT1 e quais regiões do gene seriam importantes para a suscetibilidade genética no TDAH em nossa população. No presente trabalho foi possível mostrar que o gene DAT1 parece ter um papel importante na genética do transtorno mesmo quando a variante mais estudada (VNTR 3') não está associada à doença. Também foi possível compreender esses resultados baseados na estrutura do desequilíbrio de ligação do gene, e observamos que esta é muito semelhante à estrutura encontrada em outros dois estudos publicados (Brookes e cols. 2006;

Friedel e cols. 2007). Dessa forma, nossos resultados sugerem fortemente que o fenômeno da heterogeneidade alélica possa ocorrer neste gene. E esta talvez, seja a conclusão mais importante deste estudo. Estes achados podem contribuir de maneira significativa na compreensão da influência do gene DAT1 no TDAH, e talvez ajudar a entender as divergências como um todo nos estudos moleculares no TDAH.

Estas conclusões não excluem que outros níveis de complexidade sejam importantes no problema. É possível que existam endofenótipos no TDAH úteis nas análises genéticas. Bem como é muito provável que os fatores ambientais importantes para o transtorno estejam interagindo com os genéticos. Além disto, podem existir além de diferentes combinações alélicas, diferentes combinações gênicas atuando no desenvolvimento do fenótipo. Estas questões apresentam-se como alternativas para a continuação do nosso trabalho. Outra perspectiva seria um enfoque nos estudos funcionais através de estudos de expressão gênica.

O futuro dos estudos moleculares para TDAH no âmbito internacional aponta para estudos em larga escala tanto no que diz respeito ao grande número de genes/variantes analisadas, quanto ao tamanho das amostras. A questão do tamanho amostral sempre foi motivo de preocupação nos estudos de associação. Considerando, ainda, que está cada vez mais consolidada a idéia de genes com efeito pequeno, estratégias para aumentar o poder dos estudos também vêm sendo requisitadas. As meta-análises e projetos multicêntricos, onde vários grupos analisam conjuntamente suas amostras, se apresentam como alternativa para contornar o viés do tamanho amostral. O trabalho de maior impacto na área foi a publicação dos resultados de um consórcio internacional multicêntrico (IMAGE) que totalizou 776 famílias de crianças com TDAH do tipo combinado provenientes de 8 diferentes países da Europa (Bélgica, Inglaterra, Alemanha, Holanda, Irlanda, Israel, Espanha, e Suíça). Foram genotipados 1038 SNPs em 51 genes autossômicos para testes de associação baseados em famílias. Destes genes analisados, 18 mostraram associação com a doença com um ou mais SNPs, incluindo os genes DAT1 e DRD4 (Brookes e cols., 2006b). Embora, estes estudos minimizem o problema do tamanho amostral, eles acabam criando

também outras dificuldades. Por um lado há um risco maior de aparecer algum efeito de estratificação populacional, uma vez que geralmente muitos países estão envolvidos. Um trabalho recente analisando este aspecto na amostra do IMAGE estimou que grande parte dos resultados significantes eram efeitos da estratificação populacional, principalmente introduzidos pela amostra de Israel (Neale e cols., 2008). Por outro lado, se considerarmos que a questão da heterogeneidade genética pode ser importante na doença, ao reunirmos amostras de localidades distintas podemos estar mascarando estes efeitos. Ainda existe um outro ponto importante a se considerar nestes estudos de varredura. No momento em que analisamos muitos genes a chance de erro tipo I aumenta, sendo necessário uma correção estatística mais conservadora, diminuindo, então a chance de detectar efeitos modestos.

A genética do TDAH se desenvolveu muito nos últimos dez anos, e especialmente nos últimos cinco anos com uma velocidade impressionante. Entretanto, nota-se que os avanços tecnológicos foram enormes permitindo esta rapidez, mas em termos de conhecimento pouco se avançou. Talvez seja o momento da genética psiquiátrica rever seus paradigmas, aliando as grandes varreduras com abordagens de associação mais criativas sem esquecer das singularidades que cada população pode apresentar.

No que diz respeito à aplicação dos conhecimentos gerados com os estudos moleculares no TDAH parece que estamos numa fase ainda precoce. A genética psiquiátrica vem se desenvolvendo rapidamente, muitos avanços foram conquistados, mas parece que ainda estamos longe de revelar toda complexidade da genética da doença. Em primeiro lugar precisamos entender quais os genes que realmente são importantes, quais as variantes funcionais, e de que maneira eles estão influenciando a doença. Com esta informação, então, poderemos pensar na aplicação dos achados. A aplicação desta informação pode ser vislumbrada para o futuro através de várias maneiras: auxílio no diagnóstico, aprimoramento dos fármacos existentes e desenvolvimento de novos fármacos. Também poderíamos pensar em identificar as pessoas mais vulneráveis no intuito de manejar as variáveis ambientais. Contudo, estamos ainda montando as peças

deste “quebra-cabeça”, quem sabe quando completarmos este quadro complexo e fascinante nós poderemos reverter este conhecimento para benefício dos pacientes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

American Psychiatric Association (1994) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Ed. (DSM-IV). Washington: American Psychiatric Association.

Anderson JC (1996) Is childhood hyperactivity the product of Western culture? *Lancet* 348: 73–74.

Arcos-Burgos M, Castellanos FX, Pineda D, Lopera F, Palacio JD, Palacio LG, Rapoport JL, Berg K, Bailey-Wilson JE, Muenke M (2004) Attention-deficit/hyperactivity disorder in a population isolate: linkage to loci at 4q13.2, 5q33.3, 11q22, and 17p11. *Am J Hum Genet* 75: 998-1014.

Asherson P, IMAGE Consortium (2004) Attention-Deficit Hyperactivity Disorder in the post-genomic era. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 13: 150-170.

Asherson P, Brookes K, Franke B, Chen W, Gill M, Ebstein RP, Buitelaar J, Banaschewski T, Sonuga-Barke E, Eisenberg J *et al.* (2007) Confirmation that a specific haplotype of the dopamine transporter gene is associated with combined-type ADHD. *Am J Psychiatry* 164: 674-677.

Asherson P, Zhou K, Anney RJ, Franke B, Buitelaar J, Ebstein R, Gill M, Altink M, Arnold R, Boer F *et al.* (2008) A high-density SNP linkage scan with 142 combined subtype ADHD sib pairs identifies linkage regions on chromosomes 9 and 16. *Mol Psychiatry* 13: 514-521.

Arnsten AF, Li BM (2005) Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biol Psychiatry* 57: 1377-1384.



Arnsten AF, Steere JC, Hunt RD (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.

Bakker SC, van der Meulen EM, Buitelaar JK, Sandkuijl LA, Pauls DL, Monsuur AJ, van 't Slot R, Minderaa RB, Gunning WB, Pearson PL *et al.* (2003) A whole-genome scan in 164 Dutch sib pairs with attention-deficit/hyperactivity disorder: suggestive evidence for linkage on chromosomes 7p and 15q. *Am J Hum Genet* 72: 1251-1260.

Bakker SC, van der Meulen EM, Oteman N, Schelleman H, Pearson PL, Buitelaar JK, Sinke RJ (2005) DAT1, DRD4, and DRD5 polymorphisms are not associated with ADHD in Dutch families. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 132: 50-52.

Bannon MJ, Michelhaugh SK, Wang J, Sacchetti P (2001) The human dopamine transporter gene: gene organization, transcriptional regulation, and potential involvement in neuropsychiatric disorders. *Eur Neuropsychopharmacol* 11: 449-455.

Barkley RA (1997) Behavioral inhibition, sustained attention, and executive functions: constructing a unifying theory of ADHD. *Psychol Bull* 121: 65-94.

Barkley RA, Murphy KR, Dupaul GI, Bush T (2002) Driving in young adults with attention deficit hyperactivity disorder: knowledge, performance, adverse outcomes, and the role of executive functioning. *J Int Neuropsychol Soc* 8: 655-672.

Barr CL, Xu C, Kroft J, Feng Y, Wigg K, Zai G, Tannock R, Schachar R, Malone M, Roberts W *et al.* (2001) Haplotype study of three polymorphisms at the dopamine

transporter locus confirm linkage to attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 49: 333-339.

Becker K, El-Faddagh M, Schmidt MH, Esser G, Laucht M (2008) Interaction of dopamine transporter genotype with prenatal smoke exposure on ADHD symptoms. *J Pediatr* 152: 263-269.

Biederman J (1998) Attention-deficit/hyperactivity disorder: A life span perspective. *J Clin Psychiatry* 59: 4-16.

Biederman J, Faraone SV, Keenan K, Benjamin J, Krifcher B, Moore C, Sprich-Buckminster S, Udaglia K, Jellinek MS, Steingard R *et al.* (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.

Biederman J, Milberger S, Faraone SV, Kiely K, Guite J, Mick E, Ablon S, Warburton R, Reed E (1995) Family-environment risk factors for attention-deficit hyperactivity disorder. A test of Rutter's indicators of adversity. *Arch Gen Psychiatry* 52: 464-4670.

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

Brookes KJ, Mill J, Guindalini C, Curran S, Xu X, Knight J, Chen CK, Huang YS, Sethna V, Taylor E *et al.* (2006a) A common haplotype of the dopamine transporter gene associated with attention-deficit/hyperactivity disorder and interacting with maternal use of alcohol during pregnancy. *Arch Gen Psychiatry* 63: 74-81.

Brookes K, Xu X, Chen W, Zhou K, Neale B, Lowe N, Anney R, Franke B, Gill M, Ebstein R *et al.* (2006b) The analysis of 51 genes in DSM-IV combined type attention deficit hyperactivity disorder: association signals in DRD4, DAT1 and 16 other genes. *Mol Psychiatry* 11: 934-953.

Bush G, Spencer TJ, Holmes J, Shin LM, Valera EM, Seidman LJ, Makris N, Surman C, Aleari M, Mick E *et al.* (2008) Functional magnetic resonance imaging of methylphenidate and placebo in attention-deficit/hyperactivity disorder during the multi-source interference task. *Arch Gen Psychiatry* 65: 102-114.

Castellanos FX (1997) Toward a pathophysiology of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Clin Pediatr* 36: 381-393.

Castellanos FX, Lee PP, Sharp W, Jeffries NO, Greenstein DK, Clasen LS, Blumenthal JD, James RS, Ebens CL, Walter JM *et al.* (2002) Developmental trajectories of brain volume abnormalities in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *JAMA* 288: 1740-1748.

Chen CK, Chen SL, Mill J, Huang YS, Lin SK, Curran S, Purcell S, Sham P, Asherson P (2003) The dopamine transporter gene is associated with attention deficit hyperactivity disorder in a Taiwanese sample. *Mol Psychiatry* 8: 393-396.

Cook EH, Stein MA, Krasowski MD, Cox NJ, Olkon DM, Kieffer JE, Leventhal BL (1995) Association of attention deficit disorder and the dopamine transporter gene. *Am J Hum Gen* 56: 993-998.

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.

Das M, Mukhopadhyay K (2007) DAT1 3'-UTR 9R allele: preferential transmission in Indian children with attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144: 826-829.

DiMaio S, Grizenko N, Joober R (2003) Dopamine genes and attention deficit hyperactivity disorder: a review. *J Psychiatry Neurosci* 28: 27-38.

Dougherty DD, Bonab AA, Spencer TJ, Rauch SL, Madras BK, Fischman AJ (1999) Dopamine transporter density in patients with attention deficit hyperactivity disorder. *Lancet* 354: 2132-2133.

Doyle AE, Willcutt EG, Seidman LJ, Biederman J, Chouinard VA, Silva J, Faraone SV (2005) Attention-deficit/hyperactivity disorder endophenotypes. *Biol Psychiatry* 57: 1324-1335.

Dresel S, Krause J, Krause KH, LaFougere C, Brinkbaumer K, Kung HF, Hahn K, Tatsch K (2000) Attention deficit hyperactivity disorder: binding of [<sup>99m</sup>Tc]TRODAT-1 to the dopamine transporter before and after methylphenidate treatment. *Eur J Nucl Med* 27: 1518-1524.

Durston S, Hulshoff Pol HE, Schnack HG, Buitelaar JK, Steenhuis MP, Minderaa RB, Kahn RS, van Engeland H (2004) Magnetic resonance imaging of boys with attention-deficit/hyperactivity disorder and their unaffected siblings. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 43: 332-340.

Epstein JN, Conners CK, Erhard TD, Arnold LE, Hechtman L, Hinshaw SP, Hoza B, Newcorn JH, Swanson JM, Vitiello B (2000) Familial aggregation of ADHD characteristics. *J Abnormal Child Psychol* 28: 585-594.

Faraone SV, Biederman J (1998) Neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 44: 951-958.

Faraone SV, Biederman J, Chen WJ, Krifcher B, Keenan K, Moore C, Sprich S, Tsuang MT (1992) Segregation analysis of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychiatr Genet* 2: 257-275.

Faraone SV, Biederman J, Weber W, Russel 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 Adolesc Psychiatry* 37: 185-193.

Faraone SV, Sergeant J, Gillberg C, Biederman J (2003) The worldwide prevalence of ADHD: is it an American condition? *World Psychiatry* 2: 104-113.

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

Faraone SV, Doyle AE, Lasky-Su J, Sklar PB, D'Angelo E, Gonzalez-Heydrich J, Kratochvil C, Mick E, Klein K, Rezac AJ *et al.* Linkage analysis of attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* (in press).

Feng Y, Wigg KG, Makkar R, Ickowicz A, Pathare T, Tannock R, Roberts W, Malone M, Kennedy JL, Schachar R *et al.* (2005) Sequence variation in the 3'-untranslated region of the dopamine transporter gene and attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 139: 1-6.

Fisher SE, Francks C, McCracken JT, McGough JJ, Marlow AJ, MacPhie IL, Newbury DF, Crawford LR, Palmer CG, Woodward JA *et al.* (2002) A genomewide scan for loci involved in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Hum Genet* 70: 1183-1196.

Friedel S, Saar K, Sauer S, Dempfle A, Walitza S, Renner T, Romanos M, Freitag C, Seitz C, Palmason H *et al.* (2007) Association and linkage of allelic variants of the dopamine transporter gene in ADHD. *Mol Psychiatry* 12: 923-933.

Galili-Weisstub E, Levy S, Frisch A, Gross-Tsur V, Michaelovsky E, Kosov A, Meltzer A, Goltser T, Serretti A, Cusin C *et al.* (2005) Dopamine transporter haplotype and attention-deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 10: 617-618.

Gill M, Daly G, Heron S, Hawi Z, Fitzgerald M (1997) Confirmation of association between attention deficit hyperactivity disorder and a dopamine transporter polymorphism. *Mol Psychiatry* 2: 311-313.

Giros B, el Mestikawy S, Godinot N, Zheng K, Han H, Yang-Feng T, Caron MG (1992) Cloning, pharmacological characterization, and chromosome assignment of the human dopamine transporter. *Mol Pharmacol* 42: 383-390.

Greenwood TA, Kelsoe JR (2003) Promoter and intronic variants affect the transcriptional regulation of the human dopamine transporter gene. *Genomics* 82: 511-520.

Greenwood TA, Alexander M, Keck PE, McElroy S, Sadovnick AD, Remick RA, Kelsoe JR (2001) Evidence for linkage disequilibrium between the dopamine transporter and bipolar disorder. *Am J Med Genet* 105: 145-151.

Greenwood TA, Alexander M, Keck PE, McElroy S, Sadovnick AD, Remick RA, Shaw SH, Kelsoe JR (2002) Segmental linkage disequilibrium within the dopamine transporter gene. *Mol Psychiatry* 7: 165-173.

Grunhage F, Schulze TG, Muller DJ, Lanczik M, Franzek E, Albus M, Borrmann-Hassenbach M, Knapp M, Cichon S, Maier W *et al.* (2000) Systematic screening

for DNA sequence variation in the coding region of the human dopamine transporter gene (DAT1). *Mol Psychiatry* 5: 275-282.

Hartl DL, Clark AG. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates: Massachusetts, 1990. Citado em Greenwood e cols. 2002.

Hawi Z, Lowe N, Kirley A, Gruenhage F, Nothen M, Greenwood T, Kelsoe J, Fitzgerald M, Gill M (2003) Linkage disequilibrium mapping at DAT1, DRD5 and DBH narrows the search for ADHD susceptibility alleles at these loci. *Mol Psychiatry* 8: 299-308.

Hebebrand J, Dempfle A, Saar K, Thiele H, Herpertz-Dahlmann B, Linder M, Kiefl H, Remschmidt H, Hemminger U, Warnke A *et al.* (2006) A genome-wide scan for attention-deficit/hyperactivity disorder in 155 German sib-pairs. *Mol Psychiatry* 11: 196-205.

Holmes J, Payton A, Barrett JH, Hever T, Fitzpatrick H, Trumper AL, Harrington R, McGuffin P, Owen M, Ollier W *et al.* (2000) A family-based and case-control association study of the dopamine D4 receptor gene and dopamine transporter gene in attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 5: 523-530.

Johansson S, Halleland H, Halmøy A, Jacobsen KK, Landaas ET, Dramsdahl M, Fasmer OB, Bergsholm P, Lundervold AJ, Gillberg C *et al.* Genetic analyses of dopamine related genes in adult ADHD patients suggest an association with the DRD5-microsatellite repeat, but not with DRD4 or SLC6A3 VNTRs. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* (in press).

Kang AM, Palmatier MA, Kidd KK (1999) Global variation of a 40-bp VNTR in the 3'-untranslated region of the dopamine transporter gene (SLC6A3). *Biol Psychiatry* 46: 151-160.

Kelada SN, Costa-Mallen P, Checkoway H, Carlson CS, Weller TS, Swanson PD, Franklin GM, Longstreth WT Jr, Afsharinejad Z, Costa LG (2005) Dopamine transporter (SLC6A3) 5' region haplotypes significantly affect transcriptional activity in vitro but are not associated with Parkinson's disease. *Pharmacogenet Genomics* 15: 659-668.

Kouzmenko AP, Pereira AM, Singh BS (1997) Intronic sequences are involved in neural targeting of human dopamine transporter gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 240: 807-811.

Krause KH, Dresel SH, Krause J, Kung HF, Tatsch K (2000) Increased striatal dopamine transporter in adult patients with attention deficit hyperactivity disorder: effects of methylphenidate as measured by single photon emission computed tomography. *Neurosci Lett* 285: 107-110.

LaHoste GJ, Swason JM, Wigal SB, Glabe C, Wigal T, King N, Kennedy JL (1996) Dopamine D4 receptor gene polymorphism is associated with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 1: 121-124.

Langley K, Turic D, Peirce TR, Mills S, Van Den Bree MB, Owen MJ, O'Donovan MC, Thapar A (2005) No support for association between the dopamine transporter (DAT1) gene and ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 139: 7-10.

Laucht M, Skowronek MH, Becker K, Schmidt MH, Esser G, Schulze TG, Rietschel M (2007) Interacting effects of the dopamine transporter gene and psychosocial adversity on attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms among 15-year-olds from a high-risk community sample. *Arch Gen Psychiatry* 64: 585-590.

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.

Li D, Sham PC, Owen MJ, He L (2006) Meta-analysis shows significant association between dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Hum Mol Genet* 15: 2276-2284.

Lim MH, Kim HW, Paik KC, Cho SC, Yoon DY, Lee HJ (2006) Association of the DAT1 polymorphism with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): a family-based approach. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141: 309-311.

Lowe N, Kirley A, Hawi Z, Sham P, Wickham H, Kratochvil CJ, Smith SD, Lee SY, Levy F, Kent L *et al.* (2004) Joint analysis of the DRD5 marker concludes association with attention-deficit/hyperactivity disorder confined to the predominantly inattentive and combined subtypes. *Am J Hum Genet* 74: 348-356.

Maher BS, Marazita ML, Moss HB, Vanyukov MM (1999) Segregation analysis of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)* 88: 71-78.

Mannuzza S, Klein RG, Moulton JL (2003) Persistence of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder into adulthood: what have we learned from the prospective follow-up studies? *J Atten Disord* 7: 93-100.

Mick E, Biederman J, Faraone SV, Sayer J, Kleinman SE (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.

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

Mill J, Asherson P, Browes C, D'Souza U, Craig I (2002) Expression of the dopamine transporter gene is regulated by the 3' UTR VNTR: Evidence from brain and lymphocytes using quantitative RT-PCR. *Am J Med Genet* 114: 975-979.

Mill J, Caspi A, Williams BS, Craig I, Taylor A, Polo-Tomas M, Berridge CW, Poulton R, Moffitt TE (2006) Prediction of heterogeneity in intelligence and adult prognosis by genetic polymorphisms in the dopamine system among children with attention-deficit/hyperactivity disorder: evidence from 2 birth cohorts. *Arch Gen Psychiatry* 63: 462-469.

Morino H, Kawarai T, Izumi Y, Kazuta T, Oda M, Komure O, Uda F, Kameyama M, Nakamura S, Kawakami H (2000) A single nucleotide polymorphism of dopamine transporter gene is associated with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 47: 528-531.

Nakamura Y, Koyama K, Matsushima M (1998) VNTR (variable number of tandem repeat) sequences as transcriptional, translational, or functional regulators. *J Hum Genet* 43: 149-152.

Neuman RJ, Lobos E, Reich W, Henderson CA, Sun LW, Todd RD (2007) Prenatal smoking exposure and dopaminergic genotypes interact to cause a severe ADHD subtype. *Biol Psychiatry* 61:1320-1328.

Nigg JT, Goldsmith HH (1998) Developmental psychopathology, personality, and temperament: Reflections on recent behavioral genetics research. *Hum Biol* 70: 387-412.

Ogdie MN, Fisher SE, Yang M, Ishii J, Francks C, Loo SK, Cantor RM, McCracken JT, McGough JJ, Smalley SL *et al.* (2004) Attention deficit hyperactivity disorder: fine mapping supports linkage to 5p13, 6q12, 16p13, and 17p11. *Am J Hum Genet* 75: 661-668.

Ogdie MN, Bakker SC, Fisher SE, Francks C, Yang MH, Cantor RM, Loo SK, van der Meulen E, Pearson P, Buitelaar J *et al.* (2006) Pooled genome-wide linkage data on 424 ADHD ASPs suggests genetic heterogeneity and a common risk locus at 5p13. *Mol Psychiatry* 11: 5-8.

Organização Mundial de Saúde (1993) Classificação e Transtornos Mentais e de Comportamento da CID-10: Descrições clínicas e diretrizes diagnósticas. Porto Alegre: Editora Artes Médicas.

Palmer CG, Bailey JN, Ramsey C, Cantwell D, Sinsheimer JS, Del'Homme M, McGough J, Woodward JA, Asarnow R, Asarnow J *et al.* (1999) No evidence of linkage or linkage disequilibrium between DAT1 and attention deficit hyperactivity disorder in a large sample. *Psychiatr Genet* 9: 157-160.

Pliszka SR, Mccracken JT, Maas JW (1996) Catecholamines in attention-deficit/hyperactivity disorder: Current perspectives. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 35: 264-272.

Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, Biederman J, Rohde LA (2007) The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry* 164: 942-948.

Purper-Ouakil D, Wohl M, Mouren MC, Verpillat P, Adès J, Gorwood P (2005) Meta-analysis of family-based association studies between the dopamine transporter gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr Genet* 15: 53-59.

Quist JF, Kennedy JL (2001) Genetics of childhood disorders: XXIII. ADHD, part7: The serotonin system. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 40: 253-256.

Rohde LA, Halpern R (2004) Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade: atualização. J Pediatr 80: S61-S70.

Rohde 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 6: 716-722.

Rohde LA, Barbosa G, Tramontina S, Polanczyk G (2000) Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade: atualização diagnóstica e terapêutica. Rev Bras Psiquiatr 22 Supl 2: 7-11.

Rohde LA, Barbosa G, Polanczyk G, Eizirik M, Rasmussen ER, Neuman RJ, Todd RD (2001) Factor and latent class analysis of DSM-IV ADHD symptoms in a school sample of Brazilian adolescents. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 40: 711-718.

Rohde LA, Szobot C, Polanczyk G, Schmitz M, Martins S, Tramontina S (2005) Attention-deficit/hyperactivity disorder in a diverse culture: do research and clinical findings support the notion of a cultural construct for the disorder? Biol Psychiatry 57: 1436–1441.

Roman T, Schmitz M, Polanczyk G, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH (2001) Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Study Of Association with both the dopamine transporter gene and the dopamine D4 receptor gene. Am J Med Genet 105: 471-478.

Romanos M, Freitag C, Jacob C, Craig DW, Dempfle A, Nguyen TT, Halperin R, Walitza S, Renner TJ, Seitz C *et al.* (2008) Genome-wide linkage analysis of ADHD using high-density SNP arrays: novel loci at 5q13.1 and 14q12. Mol Psychiatry 13: 522-530.

Rowe DC, Stever C, Chase D, Sherman S, Abramowitz A, Waldman ID (2001) Two dopamine genes related to reports of childhood retrospective inattention and conduct disorder symptoms. *Mol Psychiatry* 6: 429-433.

Rubie C, Schmidt F, Knapp M, Sprandel J, Wiegand C, Meyer J, Jungkunz G, Riederer P, Stober G (2001) The human dopamine transporter gene: the 5'-flanking region reveals five diallelic polymorphic sites in a Caucasian population sample. *Neurosci Lett.* 297: 125-128.

Sacchetti P, Brownschidle LA, Granneman JG, Bannon MJ (1999) Characterization of the 5'-flanking region of the human dopamine transporter gene. *Brain Res Mol Brain Res* 74: 167-174.

Satterfield JH, Dawson ME (1971) Electrodermal correlates of hyperactivity in children. *Psychophysiology* 8: 191-197.

Seeman P, Madras BK (1998) Anti-Hyperactivity Medication: Methylphenidate and amphetamine. *Mol Psychiatry* 3: 745-753.

Shaw P, Eckstrand K, Sharp W, Blumenthal J, Lerch JP, Greenstein D, Clasen L, Evans A, Giedd J, Rapoport JL (2007) Attention-deficit/hyperactivity disorder is characterized by a delay in cortical maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 19649-19654.

Simsek M, Al-Sharbaty M, Al-Adawi S, Lawatia K (2006) The VNTR polymorphism in the human dopamine transporter gene: improved detection and absence of association of VNTR alleles with attention-deficit hyperactivity disorder. *Genet Test* 10: 31-34.

Sklar P (2005) Principles of haplotype mapping and potential applications to attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57: 1357-1366.

Smalley SL, McCough JJ, Del'Homme M, Newdeman J, Gordon E, Kim T, Liu A, McCracken JT (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.

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

Spencer T, Biederman J, Wilens T, Harding M, O'Donnell D, Griffin S (1996) Pharmacotherapy of attention-deficit hyperactivity disorder across the life cycle. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 35: 409-432.

Sprich S, Biederman J, Crawford MH, Mundy E, Faraone SV (2000) Adoptive and biological families of children and adolescents with ADHD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 39: 1432-1437.

State MW, Lombroso PJ, Paul, DL, Leckman JF (2000) The genetics of childhood psychiatric disorders: A decade of progress. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 39: 946-962.

Still GF (1902) Some abnormalpsychical conditions in childhood. *Lancet* 1:1008.

Swanson JM, Castellanos FX, Murias M, Lahoste G, Kennedy J (1998) Cognitive neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorder and hyperkinetic disorder. *Curr Opin Neurobiology* 8: 263-271.

Swanson JM, Flodman P, Kennedy J, Spence MA, Moyzis R, Schuck S, Murias M, Moriarity J, Barr C, Smith M *et al.* (2000) Dopamine genes and ADHD. *Neurosci Biobehav Rev* 24: 21-5.

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

Thapar A, Holmes J, Poulton K, Harrington R (1999) Genetic bases of attention-deficit and hyperactivity. *Br J Psychiatry* 174: 105-111.

Thapar A, Langley K, O'donovan M, Owen M (2006) Refining the attention deficit hyperactivity disorder phenotype for molecular genetic studies. *Mol Psychiatry* 11:714-720.

Thapar A, Langley K, Asherson P, Gill M (2007) Gene-environment interplay in attention-deficit hyperactivity disorder and the importance of a developmental perspective. *Br J Psychiatry* 190: 1-3.

The MTA Cooperative Group (1999) A 14- month randomized clinical trial of treatment strategies for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry* 56: 1073-1086.

Timimi S, Taylor E (2004) ADHD is best understood as a cultural construct. *Br J Psychiatry* 184: 8-9.

Tood RD (2000) Genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: Are we ready for molecular genetic studies? *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)* 96: 241-243.

Todd RD, Jong YJ, Lobos EA, Reich W, Heath AC, Neuman RJ (2001) No association of the dopamine transporter gene 3' VNTR polymorphism with ADHD subtypes in a population sample of twins. *Am J Med Genet* 105: 745-748.

Vaidya CJ, Austin G, Kirkorian G, Ridlehuber HW, Desmond JE, Glover GH, Gabrieli JDE (1998) Selective effects of methylphenidate in attention-deficit/hyperactivity disorder: A functional magnetic resonance study. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14494-14499.

Valera EM, Faraone SV, Murray KE, Seidman LJ (2007) Meta-analysis of structural imaging findings in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 61: 1361-1369.

Vandenberg DJ, Persico AM, Hawkins AL, Griffin CA, Li X, Jabs EW, Uhl GR (1992) Human dopamine transporter gene (DAT1) maps to chromosome 5p15.3 and displays a VNTR. *Genomics* 14: 1104-1106.

Vandenberg DJ, Thompson MD, Cook EH, Bendahhou E, Nguyen T, Krasowski MD, Zarrabian D, Comings D, Sellers EM, Tyndale RF *et al.* (2000) Human dopamine transporter gene: coding region conservation among normal, Tourette's disorder, alcohol dependence and attention-deficit hyperactivity disorder populations. *Mol Psychiatry* 5: 283-292.

Volkow ND (2006) Stimulant medications: how to minimize their reinforcing effects? *Am J Psychiatry* 163: 359-361.

Volkow ND, Fowler JS, Wang G, Ding Y, Gatley SJ (2002) Mechanism of action of methylphenidate: insights from PET imaging studies. *J Atten Disord* 1: S31-S43.



Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Ding YS (2005) Imaging the effects of methylphenidate on brain dopamine: new model on its therapeutic actions for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57: 1410-1415.

Waldman ID, Rowe DC, Abramowitz A, Kozel ST, Mohr JH, Sherman SL, Cleveland HH, Sanders ML, Gard JMC, 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 PH, Wolf LE, Wassertein J (2001) Adults with ADHD. *Ann N Y Acad Sci* 931: 1-16.

Wohl M, Boni C, Asch M, Cortese S, Orejarena S, Mouren MC, Gorwood P, Purper-Ouakil D. Lack of association of the dopamine transporter gene in a French ADHD sample. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* (in press).

Yang B, Chan RC, Jing J, Li T, Sham P, Chen RY (2007) A meta-analysis of association studies between the 10-repeat allele of a VNTR polymorphism in the 3'-UTR of dopamine transporter gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144: 541-550.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)