

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE VARIANTES GENÉTICAS DO  
SISTEMA DOPAMINÉRGICO EM SINTOMAS DE PACIENTES  
COM TDAH**

ORIENTADO: João Locke Ferreira de Araújo

ORIENTADOR: Dr. Renan Pedra de Souza

COORIENTADORA: Dra. Daniela Valadão Freitas Rosa

BELO HORIZONTE  
Julho de 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

**Avaliação da influência de variantes genéticas do sistema  
dopaminérgicos em sintomas de pacientes com TDAH**

**João Locke Ferreira de Araújo**

Dissertação submetida ao programa de Pós-graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Dr. Renan Pedra de Souza  
Coorientadora: Dra. Daniela Valadão  
Freitas Rosa

Área de concentração: Genética  
evolutiva e de populações.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFMG

Araújo, João Locke Ferreira de Araújo

Avaliação da influência de variantes genéticas do sistema dopaminérgico em sintomas de pacientes com TDAH [manuscrito] : Avaliação da influência de variantes genéticas do sistema dopaminérgico em sintomas de pacientes com TDAH / João Locke Ferreira de Araújo Araújo. - 2017.

73 f. : il.

Orientador: Renan Pedra de Souza Souza.

Coorientadora: Daniela Valadão Freitas Rosa Rosa.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto Ciências Biológicas.

1.TDAH. 2.Variantes genéticas. 3.neurofisiologia do sistema dopaminérgico. 4.Genética do comportamento. I.Souza, Renan Pedra de Souza. II.Rosa, Daniela Valadão Freitas Rosa. III.Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto Ciências Biológicas. IV.Título.



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

João Locke Ferreira de Araújo

252/2017  
entrada  
21/2015  
CPF:  
099.811.766-80

As oito horas e trinta minutos do dia 31 de julho de 2017, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "Avaliação da influência de variantes genéticas do sistema dopaminérgico em sintomas de pacientes com TDAH", requisito para obtenção do grau de Mestre em Genética. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Renan Pedra de Souza, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	CPF	Indicação
Renan Pedra de Souza	UFMG	06447806002	APROVADO
Daniela Valadão de Freitas Rosa	UFMG	013.553.036-91	Aprovado
Maicon Rodrigues Albuquerque	UFMG	055.218.346-40	Aprovado
Eduardo Martin Tarazona Santos	UFMG	01249405602	APROVADO

Pelas indicações, o candidato foi considerado: APROVADO  
O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 31 de julho de 2017.

Renan Pedra de Souza \_\_\_\_\_  
Daniela Valadão de Freitas Rosa \_\_\_\_\_  
Maicon Rodrigues Albuquerque \_\_\_\_\_  
Eduardo Martin Tarazona Santos \_\_\_\_\_



**"Avaliação da influência de variantes genéticas do sistema dopaminérgico em sintomas de pacientes com TDAH"**

**João Locke Ferreira de Araújo**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Renan Pedro de Souza  
UFMG

Daniela Valadão da Freitas Rosa  
UFMG

Márcion Rodrigues Albuquerque  
UFMG

Eduardo Martin Tarazona Santos  
UFMG

Belo Horizonte, 31 de julho de 2017.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Enirson e Geralda, e ao meu irmão Francisco, por toda a confiança e apoio que sempre pude contar, e por nunca duvidarem de minha capacidade.

Ao Magno, por ter sido meu maior exemplo como profissional dentro do laboratório.

Ao Antônio, pelas conversas sobre a clínica, que me foram de grande valia.

À minha coorientadora Daniela Valadão, por toda a ajuda prestada no tempo que trabalhei no CTMM.

À Cinthia, que considero minha co-orientadora não oficial, por toda a ajuda e carinho dispensados a mim durante estes dois anos.

Aos meus amigos de laboratório Monique, Taynná, Nathalia, Thayana, Edu, Gesiane, Nycolle e Gizele, por terem tornado cada minuto passado no CTMM o mais agradável possível.

Ao meu orientador Professor Renan P. de Souza, por toda a paciência e compreensão, além da enorme dedicação e preocupação para contribuir para a minha formação como profissional.

À Professora Débora Miranda, por ter cedido o espaço em seu laboratório, assim como as amostras do projeto, e me recebido de braços abertos no NITIDA.

À Lourdes, pelo carinho incondicional e por toda a orientação e apoio que me deu nos momentos mais difíceis.

À Erika, que mesmo de longe e com seus problemas se mostrou sempre presente.

As mestre Danielle e as mestrandas Thais e Gabi, por terem me ajudado com os dados do projeto TDA.

Aos meus amigos Caio, Laura, Bárbara e Mirella por todo o apoio emocional oferecido a mim com todo o carinho.

Aos meus amigos da graduação, da pós e da vida, Pablo e Fernanda, por estarem sempre presentes em cada momento.

A todos aos meus amigos e familiares que não citei aqui, mas que merecem um agradecimento especial simplesmente por fazerem parte da minha vida.

## EPÍGRAFE

*“The attention is the most important of all faculties for the development of human intelligence”*

*(Charles Darwin)*

## SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIÇÕES.....	xi
RESUMO.....	1
1-INTRODUÇÃO.....	3
1.1 EPIDEMIOLOGIA DO TDAH.....	3
1.2 NEUROFISIOLOGIA DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO.....	6
1.3 ETIOLOGIA.....	11
1.3.1 FATORES AMBIENTAIS.....	11
1.3.2 FATORES GENÉTICOS.....	12
1.4 ESTUDOS EM AMOSTRAS BRASILEIRAS.....	19
2- OBJETIVOS.....	21
1. Geral.....	21
2. Específicos.....	21
3. METODOLOGIA.....	22
3.1 AMOSTRAS.....	22
3.2 PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE MOLECULAR.....	22
3.2.1 EXTRAÇÃO DE DNA.....	22
3.2.2 DESENHO DOS INICIADORES (PRIMERS).....	24
3.2.3 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) E ELETROFORESE EM GEL.....	24
3.2.4 GENOTIPAGEM PELA PCR EM TEMPO REAL.....	27
3.2.5 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.....	30
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
4. RESULTADOS.....	32
5.DISSCUSSÃO.....	44
5.CONCLUSÃO.....	50
6.REFERÊNCIAS.....	51
7.ANEXOS.....	59

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 Sondas selecionadas para o estudo.....	28
Tabela 2 Modelos genéticos para os sintomas da dimensão de desatenção.....	37
Tabela 3 Modelos genéticos para a dimensão de hiperatividade.....	38
Tabela 4 Modelo genéticos para os sintomas de dominância .....	39

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Características clínico epidemiológicas .....	33
Quadro 2 Equilíbrio de Hardy Weinberg.....	33
Quadro 3 Estimação dos efeitos individuais - Sintomas de desatenção.....	40
Quadro 4 Estimação dos efeitos individuais - Sintomas de hiperatividade.....	40
Quadro 5 Estimação dos efeitos individuais - Sintomas combinados.....	41
Quadro 6 Modelo genético individual e ambiente.....	42
Quadro 7 Modelo genético poligênico e ambiente. ....	43

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Síntese das catecolaminas.....	7
Figura 2- Neurotransmissão dopaminérgica .....	8
Figura 3- Localização dos receptores de dopamina no cérebro. ....	10
Figura 4 - Meta-análise para o Forest Plot-DRD4 VNTR.....	15
Figura 5 - Meta-análise para o Forest Plot-DAT1 VNTR .....	16
Figura 6 - Meta-análise para o Forest Plot-Val158Met.....	17
Figura 7 - Meta-análise para o Forest Plot-Val66Met.....	18
Figura 8 - Estrutura do gene <i>BDNF</i> .....	19
Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5%-DRD4 VNTR.....	26
Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5%-DAT1 VNTR. ....	27
Figura 11 - Genotipagem para o polimorfismo Val158Met do gene COMT .....	29
Figura 12 - Genotipagem para o polimorfismo Val66Met do gene BDNF.....	29
Figura 13 - Frequências alélicas e genotípicas-DRD4 VNTR .....	34
Figura 14 - Frequências alélicas e genotípicas-DAT1 VNTR.....	35
Figura 15 - Frequências alélicas e genotípicas- Val158Met e Val66Met .....	36

## LISTA DE ABREVIações

AMPC- AMP cíclico

BDNF- Brain-Derived Neurotrophic Factor

CCEB- Critério Classificação Econômica Brasil

CNVs- Variação no número de cópias de segmentos de DNA

COMT- Catechol-O-methyltransferase

CTMM- Centro de Tecnologia em Medicina Molecular

DA- Dopamina

DAT- Dopamine Active Transporter

*DAT1*- Dopamine Active Transporter gene

*DβH*- Gene da beta hidroxilase

*DRD4*-Gene do receptor D4 dopaminérgico

DSM-V- Manual estatístico e diagnóstico de Transtornos Mentais- Quinta edição

EHW- Equilíbrio de Hardy Weinberg

EPI- Epinefrina

GDNF- Fator derivado da glia

GWAS- Estudos de associação em escala genômica

HVA- Ácido homovanílico

K-SADS- A Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia

LD- Linkage Disequilibrium

MAO- Monoamina oxidase

MB-COMT- Proteína COMT em sua forma ligada à membrana plasmática

MPH- Metilfenidato

NE- Norepinefrina

NGF- Fator de crescimento do nervo

NITIDA- Núcleo de Investigação da Impulsividade e Atenção

NTs- Neutrofinas

QI- Quociente de inteligência

SCOMT- Proteína COMT na forma solúvel

SNC- Sistema Nervoso Central

SNAP-V- Swanson, Nolan e Pelham-V

SNP-Sistema Nervoso Periférico

TAQ- Transtorno de Ansiedade Generalizada.

TC- Transtorno de Conduta

TDAH- Transtorno do Deficit de Atenção com Hiperatividade

TDT- Desequilíbrio de transmissão  
TEA- Transtorno do Espectro Autista  
TOD- Transtorno de Oposição Desafiante  
UFMG- Universidade Federal de Minas Gerais  
VMAT- Transportador de monoaminas vesicular  
VNTR- Variable Number Tandem Repeat

## RESUMO

O Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade (TDAH) é um dos transtornos psiquiátricos infantis mais prevalentes atingindo cerca de cinco por cento desta população em todo o mundo. O TDAH é definido por níveis considerados prejudiciais de desatenção e/ou hiperatividade/impulsividade, possuindo grande suscetibilidade genética. O VNTR (Variable Number Tandem Repeat) de 48pb presente no exon 3 do gene *DRD4*, o VNTR de 40pb presente na 3'UTR do gene *DAT1*, e os polimorfismos Val158Met e Val66Met dos genes *COMT* e *BDNF* foram considerados neste estudo por possuírem associação descrita na literatura com os sintomas do TDAH. Uma amostra de 87 crianças foi utilizada neste trabalho, e uma análise contínua dos sintomas do TDAH foi realizada em relação a frequências dos quatro polimorfismos descritos. Frequências alélicas e genotípicas, assim como o equilíbrio de Hardy Weinberg foram calculados, sendo que apenas o polimorfismo no *DRD4* encontrou-se fora do equilíbrio. A ausência do alelo 7R foi relacionada a maior incidência de sintomas de desatenção e combinados do que o alelo 7R em homozigose. O genótipo homozigoto 10/10 para o polimorfismo de 40pb do gene *DAT1* foi também relacionado a uma maior incidência dos sintomas de desatenção e combinados. Não houve diferença de manifestação de sintomas de desatenção e hiperatividade/impulsividade para os genótipos envolvendo os polimorfismos Val66Met e Val158Met, dos genes *COMT* e *BDNF*. A interação entre os quatro polimorfismos mostrou-se não significativa, sendo que a influência de cada variante não foi afetada pela influência das demais na intensidade dos sintomas. Também foi avaliada a interação gene ambiente na manifestação dos sintomas, onde não foi encontrada relação significativa. Dado o exposto, estudos de replicação destes resultados são necessários para a compreensão da participação destas variantes genéticas na intensidade dos sintomas de desatenção e hiperatividade/impulsividade na infância.

## ABSTRACT

Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) is one of the most prevalent childhood psychiatric disorders, accounting for close to five percent of this population worldwide. ADHD is defined by levels, in regard to principles of inattention and/or hyperactivity/impulsivity, possessing great genetic susceptibility. The 48bp VNTR (Variable Number Tandem Repeat) present in exon 3 of the *DRD4* gene, the 40bp VNTR present in the 3'UTR of the *DAT1* gene, and the Val158Met and Val66Met polymorphisms of the *COMT* genes and *BDNF* trials in the study by having association description in the literature with the symptoms of ADHD. A sample of 87 children was used in this study, and a continuous analysis of the symptoms of ADHD was performed in relation to the frequencies of the four polymorphisms. Allelic and genetic frequencies as well as the Hardy Weinberg equilibrium were calculated, with only non-*DRD4* polymorphisms found out of balance. The absence of the 7R allele was related to a higher incidence of symptoms of destruction and combined than the 7R allele in homozygosis. The 10/10 homozygous genotype for the 40bp polymorphism of the *DAT1* gene was also related to a higher incidence of the inattention symptoms and combined. There was no difference in the manifestation of symptoms of destruction and hyperactivity/impulsivity for the genotypes involving the Val66Met and Val158Met polymorphisms of the *COMT* and *BDNF* genes. The interaction between the four polymorphisms was not significant, and the influence of each variant was not affected by an influence of the others on the intensity of the symptoms. We also evaluated the environmental gene interaction in the manifestation of the symptoms, where it was not found. Based on the above, replication studies of these results are necessary for an understanding of the participation of genetic variants in the intensity of the symptoms of destruction and hyperactivity/impulsivity in childhood.

# 1-INTRODUÇÃO

## 1.1 TDAH

O Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade (TDAH) é um dos transtornos psiquiátricos infantis mais prevalentes atingindo cerca de cinco por cento desta população em todo o mundo. Embora haja diferenças na prevalência entre os estudos, a explicação para tal variação parece estar em métodos distintos do que em reais diferenças transculturais no diagnóstico do transtorno ao contrário do que ocorre para outros transtornos neuropsiquiátricos<sup>1,2</sup>. Na Europa, existe uma tendência de uma abordagem mais restritiva no diagnóstico, onde são destacados os sintomas de hiperatividade sobre os demais sintomas, e não apenas os sintomas severos, mas também os de início precoce. Até o momento permanece a dúvida sobre a melhor forma de investigação, e se essas diferenças na metodologia causam as discrepâncias existentes entre as taxas de prevalência em diferentes populações<sup>3</sup>.

O TDAH é definido por níveis considerados prejudiciais de desatenção e/ou hiperatividade/impulsividade<sup>4</sup>. Desatenção envolve incapacidade de se manter executando uma tarefa de longo prazo, dificuldade de ouvir ou prestar atenção em conversas, e perda de objetos de forma corriqueira, além de uma tendência a procrastinação<sup>5</sup>. O perfil de hiperatividade impulsividade implicam em inquietude, atividade excessiva, dificuldade de permanecer muito tempo parado em um mesmo lugar, intromissão em atividades alheias e impaciência<sup>6</sup>. É importante ressaltar que esses sintomas observados em indivíduos com o transtorno são excessivos para a idade<sup>4</sup>. Pode haver ainda, variações culturais em relação a interpretação acerca do comportamento infantil, como por exemplo, o que se poderia considerar como comportamento hiperativo<sup>7</sup>.

De acordo com o manual estatístico e diagnóstico de transtornos mentais (DSM-V), os sintomas precisam aparecer antes dos 12 anos de idade. Isso aumenta a importância de uma apresentação clínica na infância. Apesar disso, uma idade mínima para que os sintomas sejam observados não é especificada devido a problemas em se determinar um início da manifestação do transtorno, apesar de que seja comum o diagnóstico em crianças com média de idade variando entre 8 e 9 anos<sup>5</sup>.

Os relatos de adultos sobre a manifestação dos sintomas de desatenção e hiperatividade na infância não são confiáveis, e informações adicionais precisam ser levadas em consideração. O TDAH é mais frequente no sexo masculino na população

em geral, seguindo uma proporção de 2:1, ou até mesmo 3:1, dependendo no grupo. A taxa de prevalência em adultos também se diferencia em relação ao sexo, com uma diferença de 1,6:1. Entretanto, existe uma probabilidade maior entre pacientes mulheres a apresentarem características de desatenção do que entre homens<sup>4,8,9</sup>.

Na infância, o TDAH se encontra comumente relacionado com outros transtornos, como o transtorno de oposição desafiante, muito comum em crianças com TDAH, e o transtorno de conduta<sup>10,11</sup>. A manifestação dos sintomas de transtorno de oposição desafiante e transtorno de conduta levam a sérios problemas na infância, pois resultam em reações agressivas e sem controle emocional<sup>10</sup>. Além de sofrerem *bullying*, essas crianças desfazem círculos de amizade, o que prejudicam sua relação em casa com os pais e seu desenvolvimento até a idade adulta. Os sintomas do transtorno de oposição desafiante podem se manifestam em qualquer momento na vida, mas entre os 6 a 12 anos a observação se torna mais comum. A comorbidade com o TDAH é comum em até 50% dos casos, e recomenda-se que isso seja diagnosticado o quanto antes para que sejam tomadas as medidas adequadas, e que problemas de aprendizagem e baixo rendimento na escola possam ser prevenidos<sup>10,12</sup>. Em geral, o ambiente familiar costuma ser instável, mas evidências mostram que fatores genéticos e neurofisiológicos possam estar relacionados ao desenvolvimento da doença, além do componente ambiental<sup>13</sup>. A associação com o transtorno do desenvolvimento da coordenação, onde a desordem motora é descrita como sendo um sério comprometimento no desenvolvimento da coordenação também é comum na infância. Embora não aja uma terapia farmacológica eficaz, a resposta ao metilfenidato e a comorbidade com o TDAH é bastante investigada<sup>14</sup>.

Além de tudo, a manifestação de outros transtornos como depressão, ansiedade e de aprendizagem em pacientes com TDAH são mais comuns, o que indica um risco maior para esses pacientes em desenvolverem outras patologias. Apesar de apresentar remissão espontânea, o TDAH pode se manter na idade adulta causando diversos prejuízos, nos contextos social, acadêmico e profissional<sup>8</sup>.

Os critérios para a definição do diagnóstico de TDAH, assim como a denominação do transtorno passaram por alterações desde 1902, quando foi oficialmente descrito pela primeira vez. Atualmente os sintomas são categorizados em duas dimensões, uma para os sintomas de desatenção e outra para os sintomas de hiperatividade/impulsividade, sendo que o paciente pode apresentar um fenótipo combinado. A manifestação de no mínimo 6 sintomas em pelo menos uma das dimensões, sendo o máximo 9 sintomas, é necessária. Além disso, o paciente precisa

apresentar prejuízo com esses sintomas em pelo menos dois ambientes diferentes, que no caso do diagnóstico infantil, normalmente é levado em consideração o ambiente da casa e da escola. Pelo diagnóstico atual do DSM-V, a observação deve ser feita antes dos 12 anos<sup>4</sup>.

Antes dos 4 anos de idade é muito difícil distinguir sintomas de comportamento normal, de atividade motora excessiva, pois é altamente variável. Durante os anos do ensino fundamental, a caracterização dos sintomas de desatenção se torna mais fácil, pois nessa fase os sintomas se tornam mais prejudiciais. No início da adolescência é comum uma normalização, mas alguns indivíduos podem apresentar piora no quadro.

Para adolescentes mais velhos e adultos (17 anos ou mais), pelo menos cinco sintomas são necessários. Dependendo de quais dimensões são apresentadas, o paciente pode ser diagnosticado como predominantemente desatento, predominantemente hiperativo-impulsivo ou do tipo combinado, de acordo com o DSM-V (Figura 1).

#### **DESATENÇÃO**

- Não presta atenção em detalhes
- Dificuldade de manter a atenção em tarefas ou atividades lúdicas.
- Não segue instruções até o fim
- Tem dificuldade para organizar tarefas e atividades
- Evita ,não gosta ou reluta em se envolver em tarefas que exijam esforço mental prolongado
- Perde coisas necessárias para tarefas ou atividades
- Facilmente distraído por estímulos externos
- Esquecido em relação a atividades cotidianas

#### **HIPERATIVIDADE**

- Remexe ou batuca as mãos ou os pés ou se contorce na cadeira
- Levanta da cadeira em situações em que se espera que permaneça sentado
- Corre ou sobe nas coisas em situações em que isso é inapropriado
- É incapaz de brincar ou se envolver em atividades de lazer calmamente.
- Com frequência “não para”, agindo como se estivesse “com o motor ligado”
- Frequentemente fala demais

#### **IMPULSIVIDADE**

- Deixa escapar uma resposta antes que a pergunta tenha sido concluída
- Frequentemente tem dificuldade para esperar a sua vez
- Interrompe ou se intromete

Quadro 1 Sintomas de TDAH segundo o DSM-V (American Psychiatric Association, 2014).

A hiperatividade é tida como manifestação principal na pré-escola, enquanto a desatenção se torna mais evidente nos anos do ensino fundamental. Sinais de

hiperatividade na adolescência são menos comuns, com o comportamento se limitando a padrão de inquietação e sensações internas de nervosismo e impaciência<sup>15</sup>. Na vida adulta, além da desatenção e da inquietude, a impulsividade pode permanecer problemática, mesmo quando ocorre a redução da hiperatividade<sup>9</sup>.

O prognóstico é consideravelmente heterogêneo. Inicialmente acreditava-se que o manejo clínico fosse suficiente na maioria dos casos ou haveria a remissão no início da fase adulta. Vale ressaltar que o manejo é geralmente feito utilizando-se intervenções psicossociais e medicamentosas<sup>16-18</sup>. No entanto, estudos realizados durante a década de 1990 deixaram claro que o TDAH não é necessariamente um transtorno com remissão espontânea e que impacta de forma relevante a qualidade de vida de adultos e de suas famílias<sup>19,20</sup>.

Os componentes psicossociais com impacto no funcionamento adaptativo e na saúde emocional, como desestruturação familiar e presença de transtornos mentais nos pais, parecem aumentar o risco do surgimento e manutenção do transtorno<sup>21</sup>. Fatores ambientais como exposição a metais pesados e fatores nutricionais podem também modular o risco de manifestação do TDAH<sup>22,23</sup>. Logo nota-se um caráter multifatorial em relação ao componente ambiental e, em função disso, não é esperado que apenas um evento seja capaz de desencadear a manifestação do transtorno. O componente genético de susceptibilidade ao TDAH parece ser igualmente heterogêneo.

Depois de diagnosticado, o paciente deve sofrer tratamento envolvendo tanto intervenção medicamentosa, quanto orientação aos pais e aos professores, além de conselhos de como lidar com o transtorno que são passados ao portador<sup>5</sup>. A medicação faz parte do tratamento na maioria dos casos, melhorando muito a qualidade de vida do indivíduo, dependendo do nível em que se encontra a manifestação dos sintomas. No Brasil, a primeira indicação é o metilfenidato, um estimulante do córtex pré-frontal<sup>18</sup>. Este medicamento age bloqueando o transportador dopaminérgico DAT. Dessa maneira, o *DAT1*, gene que codifica essa proteína transportadora, tornou-se o primeiro alvo de estudos moleculares deste transtorno<sup>16</sup>.

## **1.2 NEUROFISIOLOGIA DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO**

A dopamina (DA) é um neurotransmissor da classe das catecolaminas, onde também são agrupadas a epinefrina (EPI) e a norepinefrina (NE). A estrutura básica das catecolaminas consiste de um catecol ligado a um grupo amina por uma ponte etil<sup>24</sup>.

Através da modulação da neurotransmissão no sistema nervoso central (SNC), a dopamina acaba por afetar processos complexos, como emoção, atenção e humor<sup>8</sup>.

As catecolaminas são formadas a partir do mesmo aminoácido tirosina, e, mesmo sendo em sua maior parte adquirido na alimentação, ele também pode ser produzido no fígado por meio da fenilalanina. Primeiramente, a tirosina é convertida em L-DOPA por oxidação da posição 3 no anel de benzeno, pela ação da enzima tirosina hidroxilase (TH)<sup>25</sup>.

O produto final da via é a DA. Esta ainda pode ser convertida em EPI pela ação da enzima feniletanolamina N-metiltransferase e em NE pela enzima dopamina hidroxilase<sup>26</sup> (Figura 2).

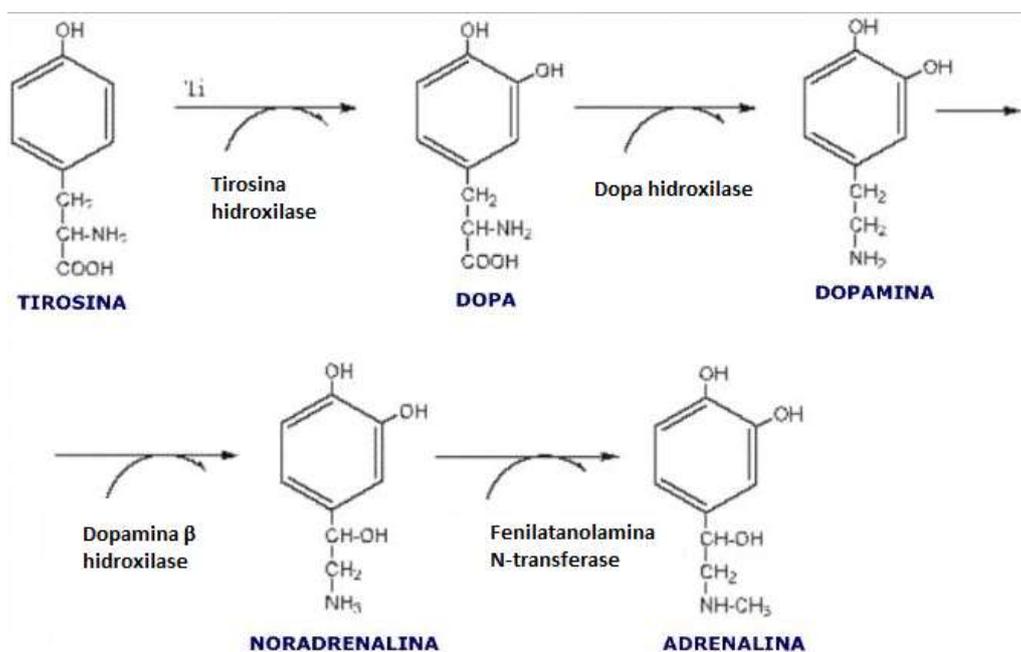


Figura 1 Síntese das catecolaminas- (Adaptado de Hare & Loer, 2004).

Após ser produzida no citoplasma, a DA é transportada por vesículas para ser armazenada ou liberada na fenda sináptica (Figura 3). A célula nervosa ao ser estimulada provoca a fusão das vesículas de armazenamento de DA na membrana, liberando-a na fenda. Uma vez na fenda, a DA pode tanto ligar-se a receptores no neurônio pós-sináptico quanto a receptores dopaminérgicos pré-sinápticos. Duas bombas moleculares são necessárias para o transporte da DA nas vesículas sinápticas: uma ATPase de prótons e o transportador de monoaminas vesicular (VMAT)<sup>24</sup>. Dentre os diversos meios de se controlar a concentração de DA na fenda, destaca-se uma proteína transmembrana que realiza a recaptação da DA para o neurônio pré-sináptico: o transportador de dopamina (DAT)<sup>27</sup>. Essa recaptação modula o sinal que é produzido pelo neurotransmissor.

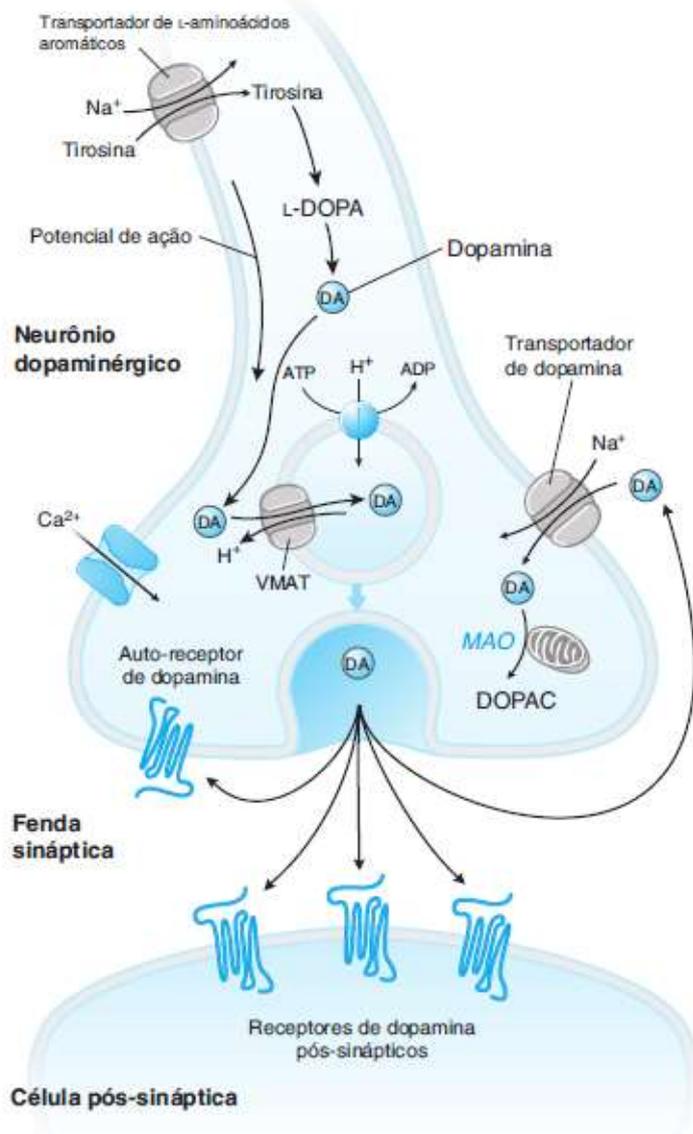


Figura 2- Neurotransmissão dopaminérgica.(adaptado de GOLAN,2009).

O transportador DAT é uma proteína de recaptção de catecolaminas, que realiza o transporte da DA contra o seu gradiente de concentração. Esse processo requer gasto de energia, o que faz com que o DAT una a recaptção com o co-transporte de  $\text{Na}^+$  ao longo do gradiente. Dessa forma, são transportados para o interior celular o  $\text{Na}^+$  e o  $\text{Cl}^-$ . A bomba de sódio e potássio mantém o gradiente de  $\text{Na}^+$  no citoplasma, portanto, a recaptção dopaminérgica pelo DAT depende desse sistema de controle, mesmo que indiretamente<sup>16</sup>.

A DA, quando recaptada, pode ser tanto armazenada de volta, e retornar a fenda pelo VMAT, quanto ser degradada no citosol pela ação da enzima monoamina oxidase (MAO)<sup>28,29</sup>. Quando liberada na fenda, a DA pode também ser degradada pela ação de

outra enzima, a catecolO-metil transferase (COMT)<sup>28</sup>. A COMT é expressa não somente no tecido nervoso, como também no fígado, no rim e no coração. Ela atua inativando as catecolaminas pela metilação do anel de benzeno da estrutura da DA. No SNC, a expressão da COMT é observada principalmente nas células neuronais. Tanto a MAO quanto a COMT degradam a DA até um nível metabólico estável, o ácido homovanílico (HVA), o qual é secretado pela urina<sup>28,30</sup>.

As proteínas receptoras de DA foram bem descritas, sendo conhecidas cinco distintas, cada uma codificada por um gene diferente, sendo que todas são proteínas acopladas à proteína G. Elas foram organizadas em duas famílias, D1, dos receptores excitatórios, D2, dos receptores inibitórios<sup>31</sup>. A família D1 engloba os receptores D1 e D5, enquanto a família D2, os receptores D2, D3 e D4, sendo que a proteína D2 possui duas formas alternativas: curta (D2S) e longa (D2L). Essa diferença não afeta a interação do receptor com a DA, entretanto afeta a sua interação com a proteína G<sup>31,32</sup>.

Todas as cinco proteínas se distribuem distintamente no cérebro, sendo que as duas famílias, D1 e D2, são bastante expressas no estriado, atuando no controle motor dos núcleos basais, assim como no tubérculo olfatório e núcleo accumbens<sup>32</sup>. As famílias de receptores são classificadas desta forma devido a sua regulação da formação do cAMP, apesar de poderem também afetar a função celular de outras formas. Expressos sobre a superfície das células pós-sinápticas, os receptores têm sua densidade controlada pela remoção e introdução de proteínas dos receptores na membrana dos neurônios pós-sinápticos<sup>24</sup>.

O papel dos receptores do tipo D2 é conhecido na esquizofrenia, já que a maioria dos medicamentos antipsicóticos apresenta afinidade por esses receptores, os quais são muito expressos na adeno-hipófise<sup>33</sup>. Os receptores D3 e D4 se assemelham aos D2 em estrutura e também parecem estar envolvidos em sintomas de esquizofrenia<sup>31</sup>. Enquanto os receptores D3 são altamente expressos no sistema límbico, os receptores D4 se encontram expressos no córtex, tronco encefálico e diencéfalo. Os receptores D5 possuem baixa expressão, apesar de apresentarem distribuição mais ampla no tecido nervoso<sup>24</sup> (Figura 4).

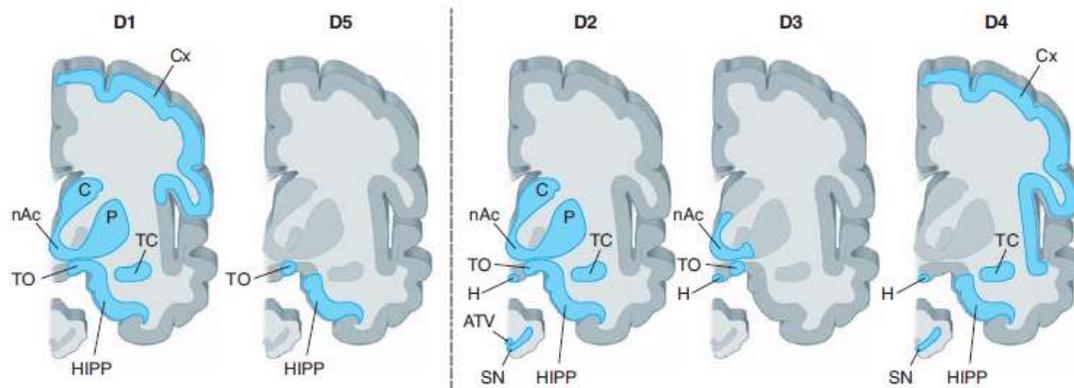


Figura 3- Localização dos receptores de dopamina no cérebro. A localização dos cinco subtipos de receptores de dopamina no cérebro humano, determinada pela localização dos mRNAs dos receptores em regiões correspondentes do cérebro do rato, é mostrada em azul em corte coronal. Abreviaturas: ATV = área tegmentar ventral, C = núcleo caudado, Cx = córtex cerebral, H = hipotálamo, HIPP = hipocampo, nAc = nucleus accumbens, P = putâmen, SN = substância negra, TC = tonsila do cerebelo, TO = tubérculo olfatório (adaptado de GOLAN,2009).

Os receptores da família D2 atuam como autorreceptores. São sensíveis ao fluxo intenso dopaminérgico, e isso faz com que reduzam a síntese de DA no neurônio pré-sináptico. Com isso, a liberação de DA e a descarga neuronal são reduzidas<sup>34</sup>.

As neurotrofinas (NTs) e o fator derivado da glia (GDNF) compõem duas famílias pertencentes aos fatores neurotróficos, atuando juntos ou separadamente na regeneração de fibras nervosas<sup>35,36</sup>. As NTs são proteínas que atuam na regulação dos mais diversos aspectos do desenvolvimento e funções neuronais, dentre eles a plasticidade sináptica e a formação de novas sinapses<sup>24</sup>. A segunda neurotrofina descoberta, depois do fator de crescimento do nervo (NGF), foi o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), sendo ele importante para a formação e maturação neuronal. O BDNF possui, na fase adulta, participação na memória episódica, tendo sua produção aumentada em seres humanos até cerca de 40 anos de idade. Após essa faixa, é normal uma diminuição de sua produção<sup>37,38</sup>.

Sendo assim, há uma notória relação do TDAH com o sistema nervoso central, principalmente no que diz respeito ao funcionamento do sistema dopaminérgico, considerando a forte relação do neurotransmissor dopamina no controle emocional e motor.

### **1.3 ETIOLOGIA**

Por se tratar de um transtorno multifatorial, o TDAH sobre influencia tanto de fatores ambientais quanto genéticos.

#### **1.3.1 FATORES AMBIENTAIS**

Atualmente, trabalhos sugerem que fatores genéticos e ambientais não atuam de forma independente, mas em um conjunto que leva ao desenvolvimento do TDAH. Esta interação ainda é pouco conhecida, mas as modificações epigenéticas estão se tornando um dos caminhos de pesquisa mais explorados que poderiam explicar a etiologia complexa dos distúrbios do desenvolvimento neurológico. Fatores ambientais podem levar a modulação da expressão gênica sem qualquer modificação de sequência de DNA<sup>1,39,40</sup>.

Os principais mecanismos de etiologia de crianças com o TDAH são baseados em fatores pré-natais. Estes fatores podem ser classificados como maternos e individuais. Dentre os fatores de risco materno, incluem-se a anemia e o abuso de substâncias, como cocaína e álcool<sup>39,41</sup>. Nos fatores de risco individuais se incluem problemas relacionados ao parto, como baixo peso ao nascer, doenças infecciosas, como meningite, encefalite e doenças da tireoide ou autoimunes, lesões na cabeça, e ingestão de toxinas<sup>42-44</sup>.

De todos os fatores, a nicotina e a exposição ao chumbo atraíram maior atenção para a compreensão da etiologia do TDAH. Em estudos populacionais, foi demonstrada associação entre o tabagismo materno durante a gravidez e a manifestação dos sintomas de TDAH<sup>20,45</sup>. A exposição a metais pesados, como o chumbo, é outro problema durante a gravidez, podendo ocorrer através da água, e do solo, sendo que crianças são mais suscetíveis a neurotoxicidade por metais. Existem estudos que apontam associação de altos níveis de chumbo no sangue a sintomas de hiperatividade<sup>46</sup>. Em relação ao contexto socioeconômico, não são conhecidos resultados de associação dos sintomas de TDAH a classes sociais.

### 1.3.2 FATORES GENÉTICOS

Estudos genéticos do TDAH seguiram um curso similar ao apresentado por outros transtornos psiquiátricos mais prevalentes, como por exemplo esquizofrenia e transtorno bipolar<sup>31,42</sup>. Tal curso iniciou-se com estudos de segregação em famílias e com gêmeos monozigóticos e dizigóticos<sup>40,41</sup>. Enquanto alguns trabalhos já sugeriam que a impulsividade apresentasse um componente genético observável em gêmeos na década de 1960, os estudos com gêmeos e TDAH, que na época era denominada disfunção cerebral mínima, tiveram início somente quando foi estimada uma herdabilidade superior a 70%, sugerindo forte susceptibilidade genética<sup>47</sup>. Os resultados de estudos de ligação e associação começaram a despontar no início da década de 1990, após o avanço da biologia molecular, observado na década anterior.

Ao contrário do visto para outros transtornos psiquiátricos, as análises de associação com genes candidatos foram mais comuns do que aquelas utilizando microssatélites para a identificação de regiões associadas com o TDAH já desde o início<sup>13,48,49</sup>. Embora alguns resultados não tivessem sido replicados, como o polimorfismo R316H no gene do receptor beta de hormônio tireodiano<sup>50</sup> vários marcadores no sistema dopaminérgico foram associados tendo seus resultados replicados em estudos posteriores<sup>51-53</sup>.

Marcadores em genes que codificam proteínas que atuam em outros sistemas de neurotransmissão já foram estudados, como receptores noradrenérgicos, colinérgicos e glutamatérgicos, enzimas de degradação de aminas biogênicas e de síntese de neurotransmissores, mas até o momento os resultados mais promissores são realmente com genes no sistema dopaminérgico. No entanto, é notório que as razões de chances observadas (inferiores a dois) não são suficientes para explicar os resultados obtidos nos estudos de herdabilidade (acima de 70%)<sup>12</sup>. Limitações metodológicas podem contar como parte de tal discrepância, mas é igualmente esperado que variantes genéticas comuns (frequências superiores a cinco por cento) não devem realmente ter um papel determinante de forma isolada e sim o conjunto de várias destas variantes seriam o suficiente para atingir um limiar no qual o componente genético atuaria de forma significativa como fator de risco<sup>13</sup>.

Trabalhos mais recentes avaliando centenas de milhares de polimorfismos conhecidos como estudos de associação em escala genômica (GWAS) apresentaram novos candidatos que ainda não foram replicados de forma suficiente para avaliar o real papel destas variantes<sup>11,54</sup>. Outros estudos com variantes raras genômicas,

conhecidas como variação no número de cópias de segmentos de DNA (CNVs), também obtiveram resultados que requerem outros estudos para uma total compreensão de seus achados<sup>51,55</sup>.

Um dos problemas de estudos genéticos é a dificuldade de extrapolação dos resultados obtidos para outras populações ou mesmo sub-populações dentro de uma amostra. A estrutura genética de populações é altamente variável e está associada a questões de ancestralidade genética e culturais em relação ao comportamento reprodutivo. Populações com baixo grau de miscigenação e em que há tendência de casamentos consanguíneos, como apresentados em certos grupos árabes, apresentam uma estrutura genética que dificilmente poderá ser utilizada como ponto inicial para uma extrapolação já que é difícil se imaginar um curso similar a esse no histórico de uma outra população. Por outro lado, populações com alto grau de miscigenação terão grande parcela de seus componentes não representados caso dados retirados de populações com baixa miscigenação sejam utilizados para inferir sua estrutura genética. Nesse contexto, resultados de estudos genéticos, que em sua maioria, utilizam populações com ancestralidades primariamente europeia, precisam ser replicados em populações como a brasileira. Esses estudos ainda são escassos considerando o grau de miscigenação apresentado. Tal escassez torna-se ainda mais notável quando se avaliam estudos genéticos de associação com transtornos psiquiátricos.

### **1.3.2.1 ESTUDOS COM GENES CANDIDATOS DO TDAH**

#### **1.3.2.2.1 GENE *DRD4***

Como abordado anteriormente, o receptor de dopamina D4, receptor acoplado à proteína G, faz parte de uma grande família proteica de receptores transmembranares que captam sinais extracelulares e ativam vias de transdução de sinal no interior da célula<sup>31</sup>. Esse receptor é codificado pelo gene *DRD4*, localizado no cromossomo 11p15.5. Os receptores D4 foram localizados no córtex frontal, diencéfalo e tronco encefálico<sup>32,56</sup>.

Tal como outros tipos de receptores dopaminérgicos, o D4 é ativado pela dopamina. É também um alvo para drogas que tratam a esquizofrenia e a doença de Parkinson<sup>31</sup>. O receptor D4 é considerado um receptor do tipo D2, no qual o receptor ativado inibe a enzima adenilatociclase, reduzindo assim a concentração intracelular do mensageiro secundário AMP cíclico (AMPC)<sup>49</sup>.

O VNTR (Variable Number Tandem Repeat) de número de 48 pares de bases (48pb) no éxon 3 do gene *DRD4* está implicado na etiologia do TDAH <sup>13</sup>. Esse polimorfismo possui variantes de 2 a 11 repetições (Figura 4).

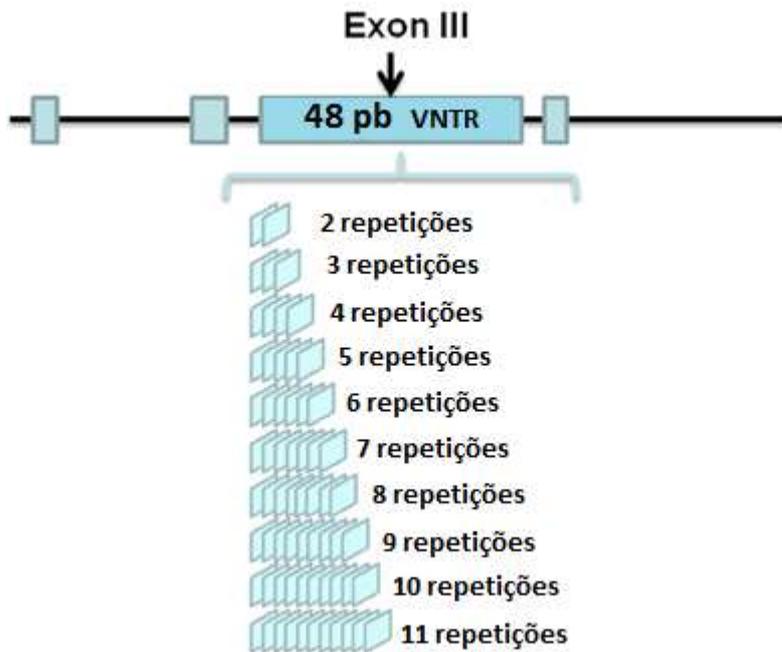


Figura 4 Representação do VNTR de 48pb presente no éxon 3 do gene *DRD4*. Esse polimorfismo possui variantes de 2 a 11 repetições. (Adaptado de JIANG, Y.; CHEW; EBSTEIN, 2013).

Os pesquisadores têm focado principalmente neste VNTR, visto que estudos mostraram uma associação da variante de 7 repetições com o TDAH em populações com ascendência europeia, pois produziria uma proteína com menor resposta à dopamina<sup>51,57</sup>. Entretanto, estudos recentes realizados com populações asiáticas constataram uma associação da variante de 2 repetições (2R) com sintomas de TDAH. A variante 2R também teria uma resposta a AMPc enfraquecida, intermediária aos alelos 4R e 7R<sup>58</sup>. Resultados de uma meta-análise indicaram um aumento de 33% na chance da manifestação do TDAH em pacientes com o alelo de sete repetições das 48 bases (Figura 4)<sup>13</sup>.

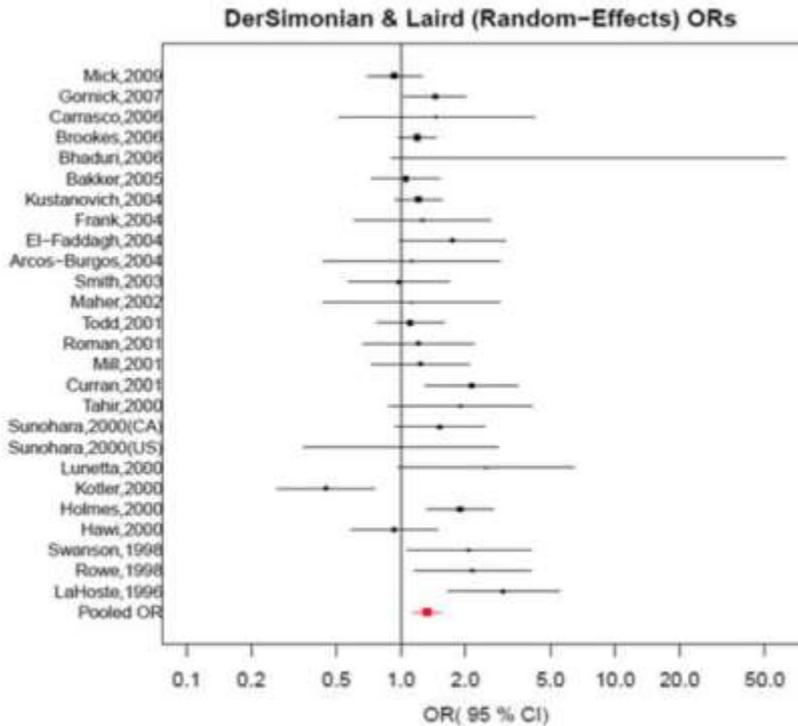


Figura 4 - Razão de chances (OR) a partir da meta-análise, do efeito do VNTR de 48pb presente no éxon 3 do gene DRD4 no TDAH (Adaptado de GIZER; FICKS; WALDMAN, 2009).

Um número maior de estudos tem analisado outros polimorfismos nesse gene. Um exemplo, é uma repetição de 120pb na região 5' (não-codificadora), localizada a 1,2kb do ponto de início da tradução do *DRD4*<sup>69</sup>.

### 1.3.2.2.2 GENE *DAT1*

O DAT é uma proteína que atravessa a membrana celular dos neurônios e bombeia a DA para fora da sinapse de volta para citosol, a partir do qual, outros transportadores sequestram DA e NE em vesículas para armazenamento e posterior liberação<sup>17</sup>. A recaptação da DA através do DAT fornece o mecanismo primário por meio do qual a DA é eliminada das sinapses, embora possa haver uma exceção no córtex pré-frontal, em que as evidências apontam para um papel possivelmente maior do transportador de NE<sup>60</sup>.

O gene *DAT1*, localizado na região 5p15.3, tornou-se o candidato inicial para as investigações moleculares a respeito do fenótipo do TDAH, uma vez que a proteína transportadora é inibida pelos estimulantes usados no tratamento do transtorno<sup>52,61</sup>. O primeiro relato de associação do *DAT1* com a doença foi feito há cerca de vinte anos, através de um estudo com um VNTR localizado na região 3'UTR do gene<sup>62</sup>. Uma

meta-análise indica que a presença do alelo mutante (10 cópias) está associada com um aumento de 12% da chance para a manifestação do TDAH<sup>13</sup> (Figura 5). Os estudos de farmacogenética envolvendo o TDAH e o metilfenidato têm se concentrado, principalmente, no gene *DAT1* e no VNTR de 40pb<sup>17,63</sup>. Foi observada uma resposta diminuída ao medicamento em portadores do genótipo homozigoto para o alelo de 10 repetições<sup>16</sup>.

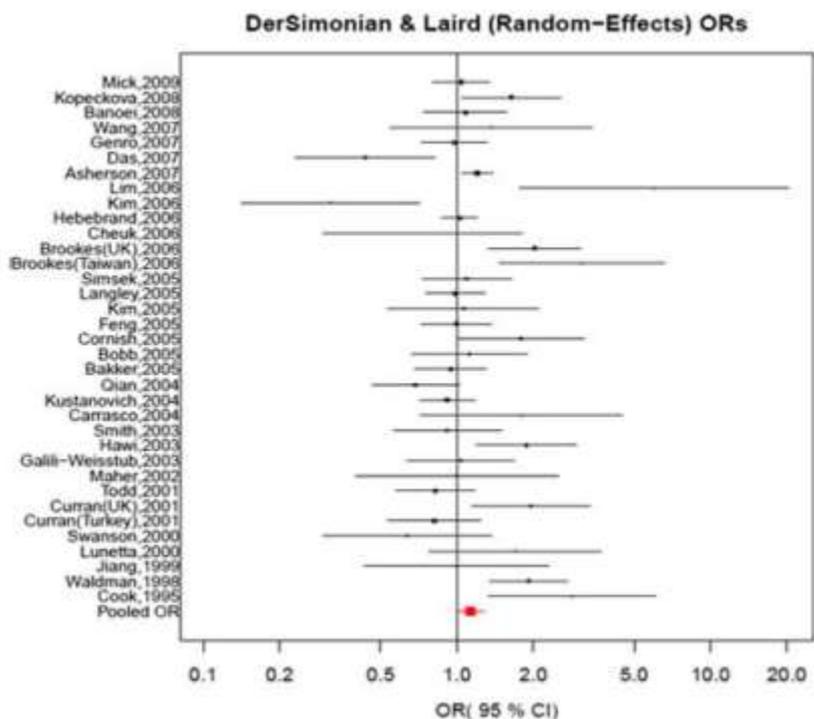


Figura 5 - Razão de chances (OR) a partir da meta-análise do efeito do VNTR de 40 pb presente na 3'UTR do gene *DAT1* no TDAH. (GIZER; FICKS; WALDMAN, 2009)

### 1.3.2.2.3 GENE *COMT*

A catecol-O-metiltransferase (*COMT*) é uma enzima metabolizadora de catecolaminas, como a dopamina e a noradrenalina<sup>64</sup>. O gene *COMT*, localizado no cromossomo 22q11, apresenta dois promotores, P1 e P2. Os dois promotores formam seus respectivos mRNAs que, por conseguinte, levam à formação de duas formas proteicas distintas: solúvel (*SCOMT*), encontrada em vários tecidos, e (*MB-COMT*), ligada à membrana plasmática<sup>24</sup>. Devido à variante Val66Met e à consequente substituição do aminoácido Valina pela Metionina, a forma solúvel apresenta atividade enzimática diferente da forma selvagem<sup>53</sup>.

A função da enzima MB-COMT no cérebro é a degradação das catecolaminas que são liberadas na fenda sináptica, regulando, portanto, a neurotransmissão dopaminérgica e noradrenérgica<sup>65</sup>. Já está bem estabelecido na literatura, que o polimorfismo Val158Met apresenta associação com sintomas de TDAH. Comparado com a variante Met, a enzima contendo a variante Val tem uma maior atividade e maior termo-estabilidade<sup>53,66,67</sup>. Em estudos caso-controle, evidências mostraram que o alelo Val foi mais frequente em crianças com TDAH do que em controles saudáveis<sup>53</sup>. Da mesma forma, estudos com o teste de desequilíbrio de transmissão mostraram uma frequência de transmissão maior do alelo Val em famílias com casos de TDAH<sup>68</sup>.

Embora em recente meta-análise não tenha sido observada associação direta do polimorfismo Val158Met no gene *COMT* e o TDAH<sup>67</sup> (Figura 6) a enzima COMT parece desempenhar um papel importante na heterogeneidade da doença, influenciando na manifestação de sintomas antissociais, muitas vezes associados ao TDAH<sup>67</sup>. Assim, diversos trabalhos sugerem que o genótipo *Val/Val* possa predispor o indivíduo a uma maior suscetibilidade aos efeitos ambientais<sup>67,69</sup>.

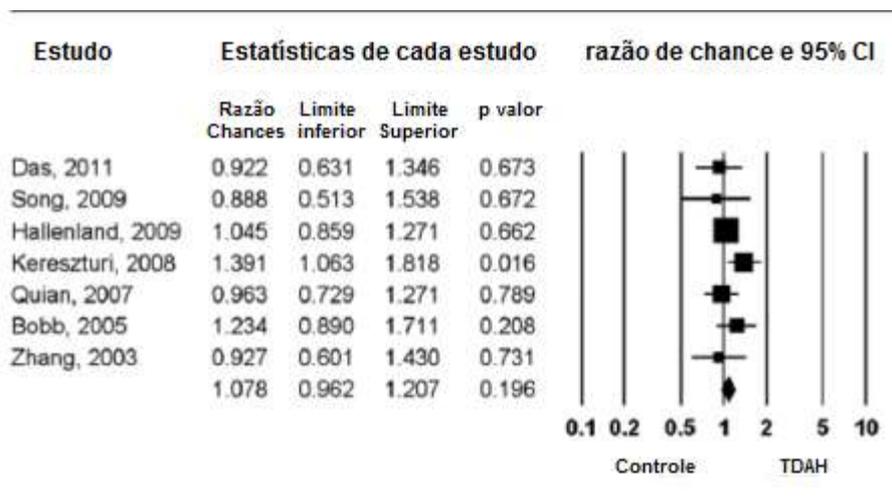


Figura 6 Razão de chances (OR) obtida através de meta-análise, do efeito do polimorfismo Va158Met no TDAH. (Adaptado de Lee et al 2015).

#### 1.3.2.2.4 GENE *BDNF*

O BDNF é uma proteína codificada pelo gene *BDNF*, localizado no cromossomo 11p14.1. O BDNF é um membro da família das neurotrofinas dos fatores de crescimento, sendo o segundo fator neurotrófico a ser caracterizado depois do NGF. Esses fatores ajudam na sobrevivência neuronal e na neurogênese<sup>37</sup>. O BDNF

age sobre os neurônios do SNC e do SNP, ajudando na manutenção dos neurônios estabelecidos e permitindo o crescimento e diferenciação de novos neurônios e sinapses. No cérebro, o BDNF está ativo no hipocampo, córtex e tronco cerebral. Quanto à sua atividade, polimorfismos nesse gene estão correlacionados com a incidência, manifestações clínicas, endofenótipos ou resposta ao tratamento do TDAH<sup>37,38</sup>.

Os polimorfismos do gene *BDNF* humano são alvos de diversos estudos nos mais variados transtornos, dentre eles o TDAH. O polimorfismo mais frequente é o Val66Met, o qual promove uma substituição de uma guanina (G) para uma adenina (A) no nucleotídeo 196 que resulta na troca do aminoácido metionina (Met) para valina (Val)<sup>36</sup>. Uma meta-análise encontrou uma fraca razão de chance (OR) de 1,01, para a associação do polimorfismo Val66Met do *BDNF* (Figura 7).

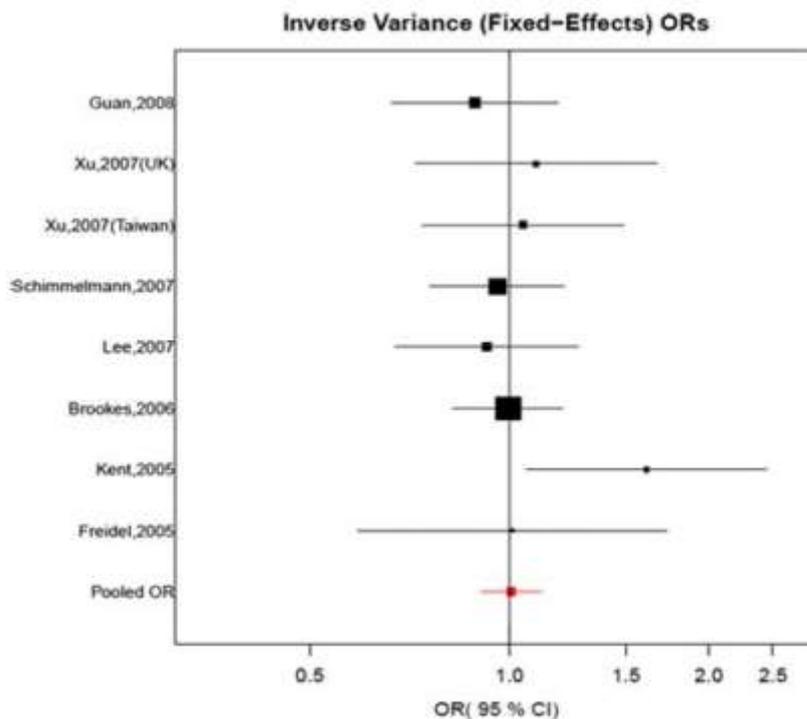


Figura 7 - Razão de chances (OR) obtida através de meta-análise, do efeito do polimorfismo Val66Met no TDAH. (Adaptado de GIZER; FICKS; WALDMAN, 2009).

Estudos recentes encontraram maior frequência do polimorfismo Val66Met em amostras de TDAH em comparação com amostras de pacientes sem o diagnóstico do transtorno<sup>70</sup>, sendo que parece existir uma maior associação de polimorfismos no gene *BDNF* nos sintomas da dimensão de desatenção do que no perfil de impulsividade/hiperatividade<sup>69</sup>. O BDNF medeia processos que são dependentes de estímulo externo, como memórias e capacidade de reter informação<sup>71</sup>.

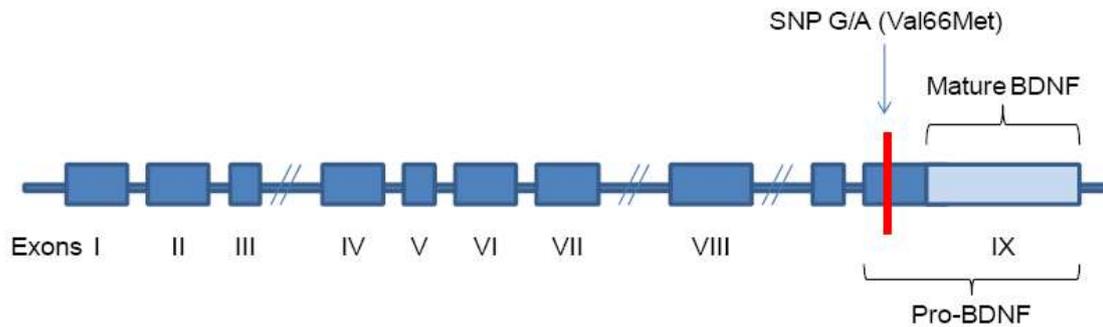


Figura 8 - Estrutura do gene *BDNF*, localizado na região 11p14.1. O polimorfismo Val66Met está localizado na região pro-*BDNF* (Adaptado de Morales, 2016).

#### 1.4 ESTUDOS EM AMOSTRAS BRASILEIRAS

No caso específico de TDAH, no Brasil quase todos os estudos apresentados foram realizados em amostras coletadas no Rio Grande do Sul, as quais apresentam ancestralidade primariamente europeia. Evidências de associação do alelo de 7 repetições (7R) do VNTR do *DRD4* foram relacionadas tanto ao fenótipo do TDAH quanto a dificuldades de aprendizagem e a menores resultados em testes de desempenho<sup>72,73</sup>. Estudos com outros polimorfismos também verificaram resultados que demonstraram relação com a ocorrência do TDAH, como estudos com o gene *DAT1*<sup>16</sup> e associação com o gene da beta hidroxilase (*DβH*), enzima que catalisa a conversão da dopamina em norepinefina<sup>74</sup>.

Também foi investigado o papel de polimorfismos no gene do receptor adrenérgico  $\alpha$ -2A em TDAH, aplicando uma abordagem baseada em estudo familiar. O polimorfismo TaqI, localizado no intron 5 do gene *DβH*, foi avaliado na maioria dos estudos<sup>73,75</sup>. Além disso, foi observada ainda, uma relação positiva entre o menor comprimento telomérico e a presença dos sintomas de TDAH<sup>76</sup>.

Uma associação entre o VNTR de 48pb do *DRD4* e o TDAH foi observada em um estudo caso-controle<sup>77</sup>. Contudo, esse resultado não foi replicado em um estudo com 243 crianças e adolescentes e seus pais, onde não foi encontrada associação significativa<sup>78</sup>. Além disso, alguns autores demonstraram que os polimorfismos do *DRD4* e *DAT1* com TDAH não foram relacionados com a variabilidade do quociente de inteligência (QI)<sup>79</sup>.

Em um estudo de desequilíbrio de transmissão (TDT) com o polimorfismo TaqI no gene *DβH*, observou-se uma transmissão preferencial do alelo A2 para crianças e adolescentes com TDAH. Em 2003, foi descrita uma associação entre o receptor

adrenérgico alfa2A (*ADRA2A*) com o fenótipo combinado de desatenção e hiperatividade<sup>75</sup>. Schmitz e colaboradores mostraram, em uma amostra de 200 crianças (dentre casos e controles), uma associação com um polimorfismo do gene *ADRA2A* e os sintomas combinados do TDAH<sup>80</sup>.

Em testes de desempenho contínuo, observou-se um aumento da perfusão no giro temporal medial direito em crianças com TDAH portadoras de alelos de risco dos genes *DRD4* e *DAT1*, quando comparado com meninos com TDAH sem alelos de risco em ambos os *loci*<sup>81</sup>.

Avaliou-se a associação entre o VNTR de 48pb do *DRD4* e o desempenho de crianças e adolescentes com TDAH em um teste de desempenho contínuo (CPT)<sup>72</sup>. A presença de um alelo com 7 repetições (7R) do *DRD4* foi associada com mais erros de omissão e o alelo de 4 repetições (4R) em homozigose foi relacionada a menos erros de omissão, mesmo após ajuste para idade. Recentemente, muitos estudos têm demonstrado que variações genéticas estão associadas a diferenças no tratamento. Assim, trabalhos realizados pelo grupo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul também descreveram um componente farmacogenético para o TDAH devido à resposta clínica ao tratamento com metilfenidato (MPH). Em um dos seus estudos, Polanczyk e colaboradores demonstraram uma associação entre o polimorfismo do gene *ADRA2A* à resposta clínica após 3 meses de tratamento com MPH em crianças e adolescentes com TDAH, mostrando uma melhora dos sintomas de desatenção (POLANCZYK *et al.*, 2007).

Um estudo com 50 indivíduos com TDAH tratados com MPH mostrou que o alelo de 10 repetições (10R) no gene *DAT1* é associado a uma resposta insatisfatória ao medicamento<sup>63</sup>. No entanto, em um experimento envolvendo 111 pacientes mostrou-se uma falta de associação entre a resposta e efeitos colaterais ao primeiro mês de tratamento com MPH com polimorfismos serotoninérgicos e nos genes dopaminérgicos *DRD4* e *DAT1* (*HTR1B*, *HTR2A* e *5-HTT*)<sup>83</sup>. Sendo assim, ressalta-se a importância de mais estudos de replicação em amostras brasileiras, com o intuito de aumentar a confiabilidade dos resultados tanto de associação polimorfismo/genótipo quanto aos estudos de resposta ao tratamento farmacológico.

## 2- OBJETIVOS

### 1. Geral

Avaliar a influência de variantes genéticas no sistema dopaminérgico sobre a manifestação dos sintomas de desatenção e hiperatividade/impulsividade em pacientes com TDAH.

### 2. Específicos

- Analisar as frequências genotípicas e alélicas do VNTR de 48pb no éxon 3 do gene *DRD4*, do VNTR de 40pb na região 3'UTR do gene *DAT1*, do polimorfismo Val158Met do gene *COMT* e do polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* em uma amostra brasileira.
- Investigar os efeitos primários individuais das variantes presentes nos genes *DAT1*, *DRD4*, *COMT* e *BDNF* na manifestação dos sintomas de desatenção e hiperatividade/Impulsividade em pacientes com TDAH.
- Investigar a interação entre as variantes presentes nos genes *DAT1*, *DRD4*, *COMT* e *BDNF* na manifestação dos sintomas de desatenção e hiperatividade/Impulsividade em pacientes com TDAH.
- Investigar a influência das classes sociais na manifestação dos sintomas de desatenção e hiperatividade/impulsividade, assim como sua relação com as frequências dos polimorfismos dos genes *DAT1*, *DRD4*, *COMT* e *BDNF* em pacientes com TDAH.

### **3. MÉTODO**

#### **3.1 AMOSTRA**

Este trabalho faz parte de um projeto de avaliação multidimensional de indivíduos com TDAH conduzido pelo Centro de Tecnologia em Medicina Molecular (CTMM) que se trata de estudo coorte em andamento no HC-UFMG (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética - CAAE -02899412.9.0000.5149).

Para o projeto foram recrutadas crianças de ambos os sexos. Foram incluídos como sujeitos de pesquisa crianças diagnosticadas para o transtorno utilizando o método de entrevista KSADS-PL (Schudule for Affective Disorders and Schizophrenia for Scholl Aged Children Presentand Life time Version) de acordo com os sintomas previstos no questionário SNAP (Swanson, Nolan e Pelham-V) baseado no DSM-V.

O SNAP é um instrumento composto por 26 itens desenvolvido para avaliação de sintomas do TDAH em crianças e adolescentes. Pode ser preenchido por pais ou professores e emprega os sintomas listados no DSM-V para o TDAH e para o transtorno de oposição desafiante. Os dados foram recolhidos no Núcleo de Investigação da Impulsividade e Atenção (NITIDA) do Hospital das Clínicas da UFMG.

Para este trabalho, foram extraídos do banco de dados do NITIDA informações da avaliação dos sintomas segundo o SNAP, e apenas os indivíduos com dados completos para as duas dimensões do TDAH foram incluídos, sendo estes o resultado da contagem dos 18 itens iniciais do SNAP (os 8 itens restantes incluem o diagnóstico do transtorno de oposição desafiante). Informações socioeconômicas segundo o Critério de Classificação Econômica Brasil (CCEB) também foram considerados, resultando em uma amostra de 87 indivíduos, entre 7 e 12 anos de idade, maioria de Belo Horizonte e região metropolitana.

#### **3.2 PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE MOLECULAR**

##### **3.2.1 EXTRAÇÃO DE DNA**

O sangue foi coletado em tubos para coleta a vácuo de 4 mL com anticoagulante EDTA. Os tubos foram invertidos manualmente 5 vezes para mistura do anticoagulante ao sangue.

Foram transferidos 4 mL de sangue para um tubo Falcon de 15 mL e adicionados 4 mL de tampão TKM (Tris, KCL e MgCl<sub>2</sub>) contendo 3% Triton X-100 (concentração final: 1.5% de Triton) mantendo a proporção de 1:1 em caso de menor quantidade de material coletado. Os tubos foram agitados por inversão aproximadamente 30 vezes, aguardando a lise das células por 2 minutos à temperatura ambiente.

A centrifugação foi realizada a 1.200 (rcf) por 10 min a 22°C, descartando o sobrenadante vertendo o tubo, até observar os pellets com 4 mL de TKM. Os tubos agitados por inversão cerca de 30 vezes e centrifugados a 1.200 g por 10 min a 22°C. O sobrenadante foi descartado vertendo o tubo e secando o excesso do líquido dando leves batidas sobre o papel toalha. Esse procedimento foi repetido pelo menos mais duas vezes ou até o *pellet* ficar branco (apenas leucócitos, livre de hemácias).

Foram adicionados 850 µL de solução TKM-SDS, misturando (vortex ou manualmente) até o *pellet* desfragmentar. Os tubos foram encubados em banho-maria a 55°C por 10 min, e após a incubação misturados novamente (vortex ou manualmente). Foram centrifugados rapidamente (400 g por 1 min) para coletar o líquido e transferi-lo para um microtubo de 1,5 mL, onde foram adicionados 300 µL de solução de NaCl 6 M. Os microtubos foram homogeneizados, lentamente, por inversão por aproximadamente 10 vezes. Os microtubos foram centrifugados na microcentrífuga, a 12.000 g por 5 min a 22°C, e o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para o tubo final de armazenamento (tubo com tampa de rosca de 2 mL) sendo descartados os tubos contendo o *pellet* de proteínas precipitadas. 450 µL de isopropanol foram adicionados ao sobrenadante e misturados por inversão lentamente até o DNA precipitar (este procedimento foi realizado a temperatura ambiente).

Uma nova centrifugação a 16.000 g foi executada por 15 min a 22°C, descartando o sobrenadante ao verter o tubo.

Para lavar o *pellet*, foi adicionado 1 mL de etanol 70% e agitado rapidamente usando o vortex sem desintegrar o *pellet*, e centrifugados a 12.000 g por 5 min a 22°C, com o sobrenadante, sendo este, descartado ao verter o tubo, sendo este procedimento repetido duas vezes.

O sobrenadante foi removido com pipeta deixando a menor quantidade de etanol possível sem perturbar o *pellet*. O tubo foi mantido de cabeça para baixo sobre papel toalha por 15 min até a completa evaporação do álcool, com a ressuspensão do DNA com 400 µL de solução TE pH 8.0. O DNA extraído foi incubado em banho-maria a

56°C por 1 semana e posteriormente armazenado a 4°C, de acordo com protocolo padrão do laboratório.

### 3.2.2 DESENHO DOS INICIADORES (PRIMERS)

Foram utilizados como referência primers descritos na literatura para o VNTR de 48pb do gene *DRD4*<sup>84</sup> e para o VNTR de 40pb do gene *DAT1*<sup>85</sup>. O primer reverse do par de iniciadores para o VNTR de 48pb do *DRD4* foi acrescido de uma base nitrogenada citosina no final da sequência para regular a temperatura de anelamento. As demais sequências permaneceram inalteradas.

Em seguida, os pares de iniciadores foram avaliados através do *software* NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>) com a finalidade de evitar pares com grandes defeitos estruturais (formação de dímeros, alças, palíndromos e repetições). E, por último, a especificidade dos *primers* escolhidos foi verificada pela análise por alinhamento local através do *software* Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Os iniciadores desenhados foram testados por PCR convencional e os produtos visualizados em gel de agarose 1% corado com 15 µL brometo de etídio 0,1% utilizando tampão TBE 1X (gel de 150 mL) onde não foi observada qualquer inespecificidade. As condições da eletroforese foram 130 mA, 120 V por aproximadamente 80 min.

Os tamanhos dos fragmentos esperados foram estimados com base no tamanho dos fragmentos dos indivíduos-modelo no NCBI, sendo estes, homozigoto para o alelo 4R do gene *DRD4* e homozigoto para o alelo 10R do gene *DAT1*.

### 3.2.3 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) E ELETROFORESE EM GEL

As reações foram realizadas no CTMM - Laboratório de Neurociência e Genética Molecular, Departamento de Saúde Mental, na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) através do aparelho T100 ThermalCycler (BioRad), utilizando o kit GoTaq Hot Start Polymerase.

O Mix foi preparado utilizando o protocolo básico de PCR para 25 uL por reação, sendo composto de água deionizada autoclavada, buffer green 5x, MgCl<sub>2</sub> 25 mM,

dNTP 25 mM, primer forward (20 pmol/ $\mu$ L), primer reverse (20 pmol/ $\mu$ L), DMSO (100%) e taq DNA Polimerase (5 U/ $\mu$ L), e adicionado 2  $\mu$ L de DNA a 50 ng/ $\mu$ L.

As reações foram padronizadas como 95°C por 5 min, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 30 seg, 58°C por 30 seg e 72°C por 1 min para o VNTR de 48pb do *DRD4* e como 95°C por 10 min, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 1 min, 61°C por 45 seg e 72°C por 1 min para o VNTR de 40pb do *DAT1*.

### **3.2.3.1 ANÁLISE ELETROFORÉTICA EM GEL DE AGAROSE**

O gel de agarose é ideal para fragmentos de 0,2kb a 50kb. Para a genotipagem do VNTR de 48pb do gene *DRD4* o gel de 1% mostrou-se eficiente para a separação dos fragmentos, já para o VNTR de 40pb do gene *DAT1* o gel a 1,5% mostrou-se mais adequado, devido à diferença de tamanho entre os fragmentos observados mais comuns ser bem menor (apenas uma repetição). O gel foi preparado utilizando uma proporção de 100 mL de TBE 1x para 1 g de agarose para um gel de 1% e uma proporção de 100 mL de TBE 1x para 1,5 g de agarose para um gel a 1,5%. A solução de brometo de etídio foi adicionada em uma proporção de 1  $\mu$ L para cada 10 mL de solução de TBE 1X mais agarose. Após a polimerização do gel, as amostras foram aplicadas nas canaletas, após mistura com tampão de corrida. O gel foi visualizado utilizando o aparelho ImageQuant, e revelado por luz ultravioleta em reação com o brometo de etídio.

A eletroforese em gel de agarose a 1,5% apresentou fragmentos de tamanhos bem variados, para a genotipagem dos polimorfismos dos genes *DRD4* e *DAT1*. Os alelos mais comuns para o *DRD4* foram os de 4, 7 e 2 repetições do VNTR, respectivamente.

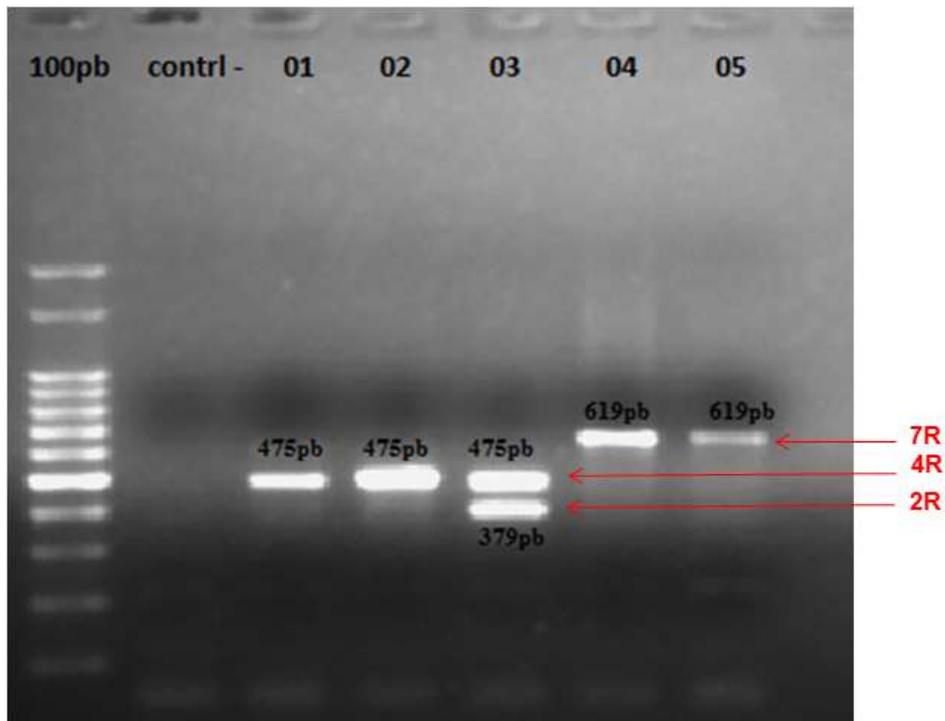


Figura 9 -Eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizado na genotipagem do polimorfismo no gene *DRD4*. Os alelos de 4 repetições (4R) foram representados por um fragmento do tamanho de 475pb nos indivíduos 01 e 02 (homozigotos), e 03 (heterozigoto). O indivíduo 03 possui também um alelo de 2 repetições (2R), representado por um fragmento de tamanho 379pb. O alelo de 7 repetições (7R) está representado na imagem pelos indivíduos 04 e 05, ambos homozigotos para o polimorfismo.

A variabilidade dos alelos na genotipagem do polimorfismo no gene *DAT1* foi maior, com fragmentos variando muito de tamanho no gel de agarose 1,5%, de fragmentos com 10, 9, 8, 7, 6 e 2 repetições do VNTR. Na imagem seguinte, temos os alelos mais frequentes, 10R e 9R, representados por fragmentos dos tamanhos 483pb e 443pb, respectivamente, e o alelo 8R, representado por um fragmento do tamanho de 403pb, em um indivíduo heterozigoto para os alelos 10R e 8R.

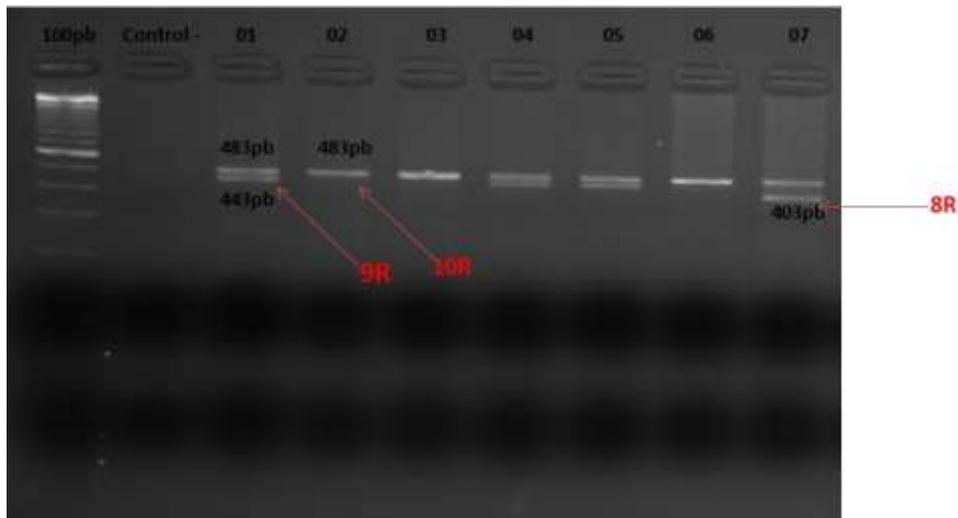


Figura 10 -Eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizado na genotipagem do polimorfismo no gene *DAT1*. Os alelos de 10 repetições sendo representados por fragmentos do tamanho de 483pb, 9 repetições por fragmentos do tamanho de 443pb e 8 repetições, com 403pb de tamanho.

### 3.2.3.2 ANÁLISE ELETROFORÉTICA EM GEL DE POLIACRILAMIDA

A análise eletroforética em gel de poliacrilamida foi utilizada para confirmação de resultados da genotipagem do VNTR do *DRD4* e para a genotipagem do VNTR do *DAT1* (a genotipagem do VNTR em *DAT1* foi realizada tanto em agarose quanto em poliacrilamida), pois a diferença de tamanho entre os fragmentos mais frequentes era apenas de 40pb, sendo assim, a visualização em poliacrilamida mostrou-se mais eficiente.

O gel de poliacrilamida foi preparado utilizando protocolo padrão de preparação, segundo a proporção de reagentes em relação ao volume final e número de géis, sendo utilizados água destilada, TBE 20x, solução de acrilamida, persulfato de amônio e N,N,N',N'-tetrametilinediamina (TEMED).

As amostras foram aplicadas nas canaletas após mistura com tampão de amostra (*gel loading buffer*). O gel foi corado para visualização utilizando solução de nitrato de prata, seguindo protocolo padrão de coloração.

### 3.2.4 GENOTIPAGEM PELA PCR EM TEMPO REAL

A genotipagem foi realizada a partir de 50 ng de DNA através de PCR em tempo real, pelo método *TaqMan® Genotyping*. Esta técnica baseia-se na replicação do fragmento de DNA de interesse, a partir da utilização de sondas (*probes*) específicas (Tabela 1)

que consistem em oligonucleotídeos ligados a um fluoróforo. Desta forma, após a hibridização das sondas à fita de DNA complementar, a DNA polimerase realiza a extensão do fragmento e, ao clivar a probe, faz com que o fluoróforo seja liberado, permitindo a detecção da fluorescência pelo equipamento. Uma vez que cada sonda apresenta uma fluorescência alelo específica, o aparelho pode realizar a discriminação alélica a partir da fluorescência liberada durante a reação.

A reação foi preparada em placas para 96 reações. Destas, 94 continham a amostra de DNA a ser genotipada e dois controles negativos, contendo todos os componentes da reação, exceto a amostra de DNA (para exclusão de contaminações). Cada reação continha 3,5 µL do kit *TaqMan® Genotyping PCR Master Mix* (Applied Biosystems Life Technologies Inc, Foster City, CA, USA), 3,4 µL de água deionizada, 0,1 µL da sonda (Applied Biosystems Life Technologies Inc, Foster City, CA, USA) e 1 µL de DNA (50 ng/µL), totalizando 8 µL.

Para a reação de PCR em tempo real, utilizou-se o aparelho Stratagene Mx3005P QPCR System (La Jolla, CA, USA). Foi realizado um ciclo de desnaturação para separação da fita dupla de DNA, com duração de 10 min a 95°C, acompanhado por cinquenta ciclos de anelamento da sonda e extensão do fragmento de DNA com duração de 15 seg a 95°C e 1 min a 60°C, respectivamente. A leitura da fluorescência foi feita ao final de cada ciclo. Para a análise dos produtos da reação, foi utilizado o modo de discriminação alélica do software que acompanha o aparelho.

Tabela 1 Sondas selecionadas para o estudo.

<b>TagSNP (Código Applied)</b>	<b>Sequência e alelo ancestral</b>
<b>COMT</b> rs4680 C__25746809_50	CCAGCGGATGGTGGATTTTCGCTGGC[A/G]TGAAGGACAAGGT GTGCATGCCTGA Alelo ancestral G
<b>BDNF</b> rs6265 C__11592758_10	TCCTCATCCAACAGCTCTTCTATCA[C/T]GTGTTTCGAAAGTGTC AGCCAATGAT Alelo ancestral G

As genotipagens para as variantes Val158Met e Val66Met foram realizadas para os *loci* dialélicos.

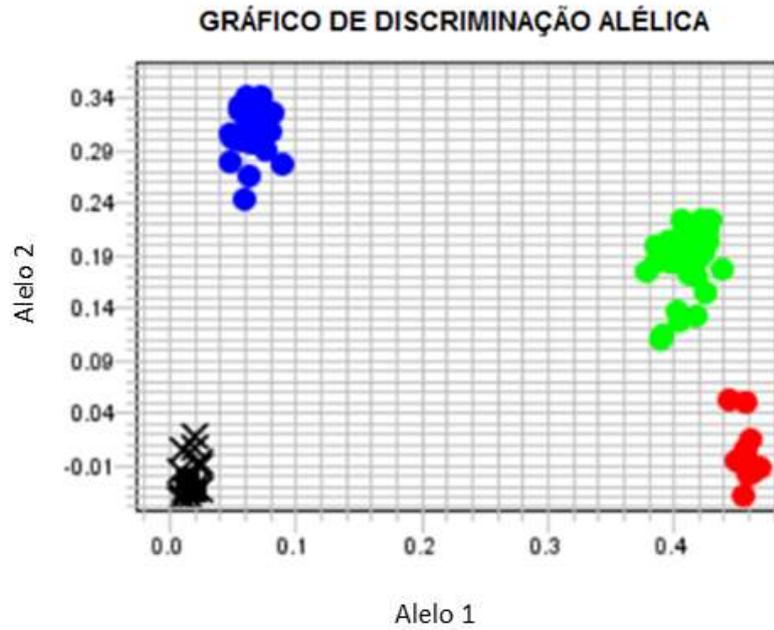


Figura 11 -Genotipagem para o polimorfismo Val158Met do gene *COMT*. Genótipos Val/Val em vermelho, Val/Met em verde e Met/Met em azul. Genótipos que não foram determinados sendo representados por X.

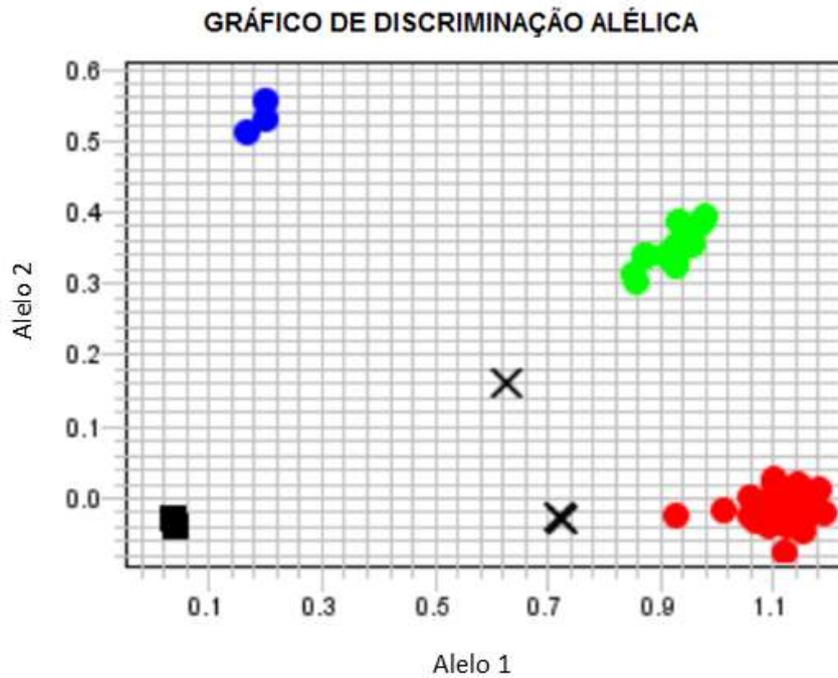


Figura 12 -Genotipagem para o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF*. Genótipos Val/Val em vermelho, Val/Met em verde e Met/Met em azul. Genótipos que não foram determinados sendo representados por X.

### 3.2.5 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento foi realizado para a confirmação dos tamanhos dos fragmentos referentes a genotipagem dos VNTRs dos genes *DRD4* e *DAT1*. Esse método é capaz de determinar a sequência de nucleotídeos de uma fita de DNA.

Antes de iniciar a primeira etapa do sequenciamento, os produtos de PCR referentes a genotipagem dos genes *DRD4* e *DAT1* foram purificados seguindo protocolo padrão utilizado no CTMM. Foram selecionadas amostras homozigotas para os alelos identificados na genotipagem. Perdeu-se DNA na purificação das amostras de PCR para o polimorfismo do *DRD4* VNTR, e o sequenciamento não foi bem sucedido. O seguimento do trabalho foi dado para o *DAT1* VNTR.

Na primeira etapa (realizada no termociclador), foram adicionados em um mesmo microtubo, tampão, DNA polimerase; terminadores de cadeia; o fragmento de DNA que se desejava sequenciar (produto amplificado da reação de PCR convencional purificado) e primers.

Foi utilizado na reação de sequenciamento o kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing. Na segunda etapa do método, foi realizada a análise através do sequenciador automático ABI3130 quatro capilares, sendo responsável pela eletroforese e identificação dos produtos sintetizados, baseando-se na diferença de comprimento de onda específica para cada um dos ddNTPs. Dois indivíduos homozigotos para os alelos 10R e 9R tiveram seus fragmentos sequenciados.

### 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis foram testadas quanto anormalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk. A verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizada por teste de Fischer. Foram realizados cálculos de frequências alélicas e genotípicas, assim como cálculo de desequilíbrio de ligação. Para a análise dos modelos genéticos foram utilizados teste t de Student e ANOVA. Foram gerados modelos genéticos de dominância, codominância, recessividade e log aditividade (quando o fenótipo se manifesta tendo como padrão o número de alelos de risco). Após a estimação dos efeitos individuais das variantes, estes efeitos foram estimados assumindo um modelo poligênico através de duas abordagens. Na primeira abordagem, modelos de regressão linear tiveram seus parâmetros inicialmente estimados para todas as quatro variantes observando modelos individuais mais significativos. No entanto, os resultados apresentam somente os modelos contendo polimorfismos significativos e, quando significativas,

suas interações. A análise dos resíduos foi realizada com o objetivo de avaliar as suposições feitas para os erros. Modelos de associação individual e poligênico foram gerados para testar a variável ambiental, utilizando os dados socioeconômicos. Todas as análises deste estudo foram realizadas no programa R versão 3.2.1, considerando um nível de significância de 5%.

#### **4. RESULTADOS**

A média de idade dos pacientes foi de 9,47 anos. Em relação às dimensões de diagnóstico, calculou-se a frequência da manifestação da dimensão dentro da amostra, sendo que o fenótipo combinado se mostrou o mais frequente (60,91%). Quando manifestado apenas uma dimensão, o fenótipo desatento apresentou 71,04% de frequência, sendo 28,73% do total de pacientes (Quadro 1).

A comorbidade com o transtorno de oposição desafiante apareceu com uma frequência considerável, sendo que 66,67% manifestaram o transtorno além do TDAH. Outros transtornos de comportamento também foram diagnosticados em menor proporção, sendo esses o transtorno do espectro autista, transtorno de conduta e transtorno de ansiedade generalizada. As crianças participantes do estudo em sua maioria realizaram ou realizam seu ciclo básico em escolas públicas (68,96%). Os indivíduos foram enquadrados principalmente em classes média/baixa e baixa (74,70%).

Quadro 2 Características clínico epidemiológicas baseadas em uma amostra de 87 crianças, entre 7 e 12 anos).

<b>Características clínico epidemiológicas</b>	
Idade: Média; mediana; desvio padrão	9,47; 9; 2
<b>Diagnóstico –Ksads</b>	
Desatenção n(%)	25 (28,73 %)
Hiperatividade n(%)	10 (11,49 %)
Combinado n(%)	52 (60,91%)
<b>Comorbidades</b>	
Transtorno de oposição desafiante n(%)	58 (66,67%)
Transtorno do espectro autista n(%)	3 ( 3,44%)
Transtorno de conduta n(%)	3 ( 3,44%)
Transtorno de ansiedade generalizada n(%)	2 ( 2,29%)
<b>Sexo</b>	
Masculino n(%)	71 (81,60%)
<b>Residência</b>	
Belo Horizonte n(%)	62 (71,26%)
Região metropolitana n(%)	20 (22,98%)
Não informado n(%)	5 (5,75%)
<b>Escola</b>	
Pública n(%)	60 (68,96%)
Privada n(%)	12 (13,79%)
Não informado	15 (17,24%)
<b>Classe CCEB</b>	
B2	7 (8,04%)
C1	34 (39,08%)
C2	13 (14,94%)
DE	18 (20,68%)
Não informado	15 (17,24%)

As amostras foram testadas quanto ao equilíbrio de Hardy Weinberg, sendo que todas demonstraram estar em equilíbrio, com exceção para o polimorfismo no gene *DRD4*, que apresentou um valor de  $p < 0,0001$  (Quadro 2). Considerando os genes *DRD4* e *BDNF* localizados no mesmo cromossomo, foi calculado o desequilíbrio de ligação entre eles, o que indicou um desequilíbrio fraco ( $R^2 = 0,0619$ ;  $n = 68$ ;  $p = 0,0042$ ).

Quadro 3 Frequência dos genótipos mais comuns para cara polimorfismo e cálculo de equilíbrio de Hardy Weinberg para as frequências alélicas e genotípicas para os quatro polimorfismos no estudo. O polimorfismo no gene *DRD4* apresentou-se fora do equilíbrio.

<b>POLIMORFISMO</b>	<b>Equilíbrio de Hardy Weinberg</b>	<b>Dados faltantes (%)</b>
<i>BDNF Val66Met</i>	0.99	2.3
<i>COMT Val158Met</i>	0.35	3.4
<i>DRD4 VNTR</i>	>0,0001	13.8
<i>DAT1 VNTR</i>	0.17	0.0

Foi calculada a frequência alélica e genotípica para os resultados de genotipagem encontrados. Para os polimorfismos dos genes *DRD4* e *DAT1*, com *loci* multialélicos, o cálculo foi realizado considerando os alelos encontrados na genotipagem (Figura 13). A composição bialélica tendo como base o alelo de risco como descrito na literatura (Figura 14).

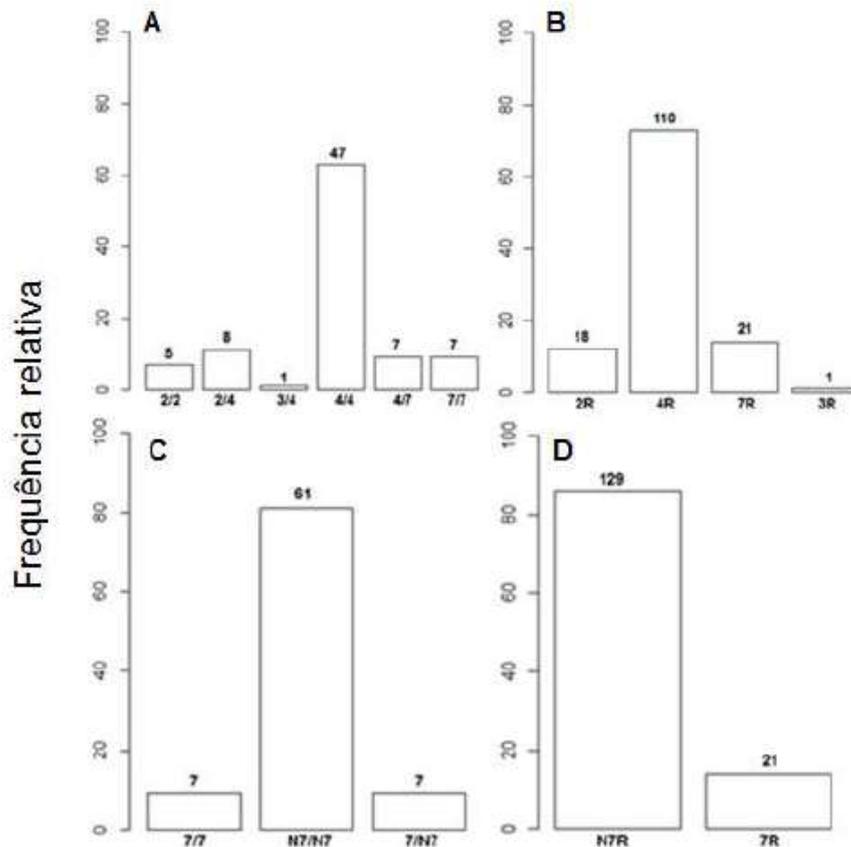


Figura 13 Cálculo das frequências genotípicas e alélicas para os loci multialélico e dialélico para os variantes no gene *DRD4*.

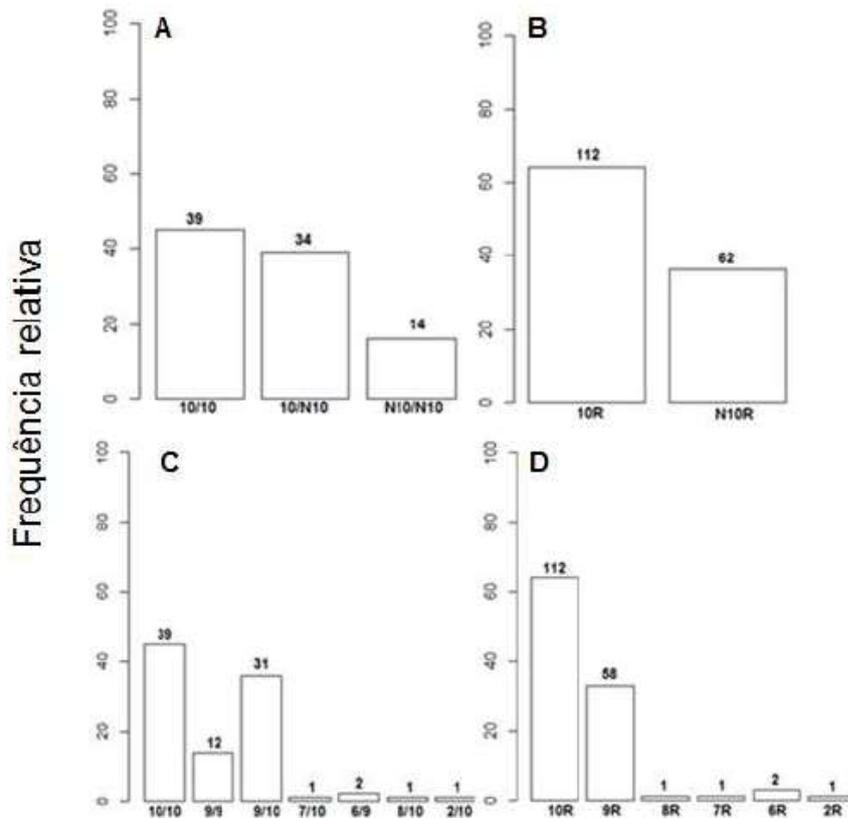
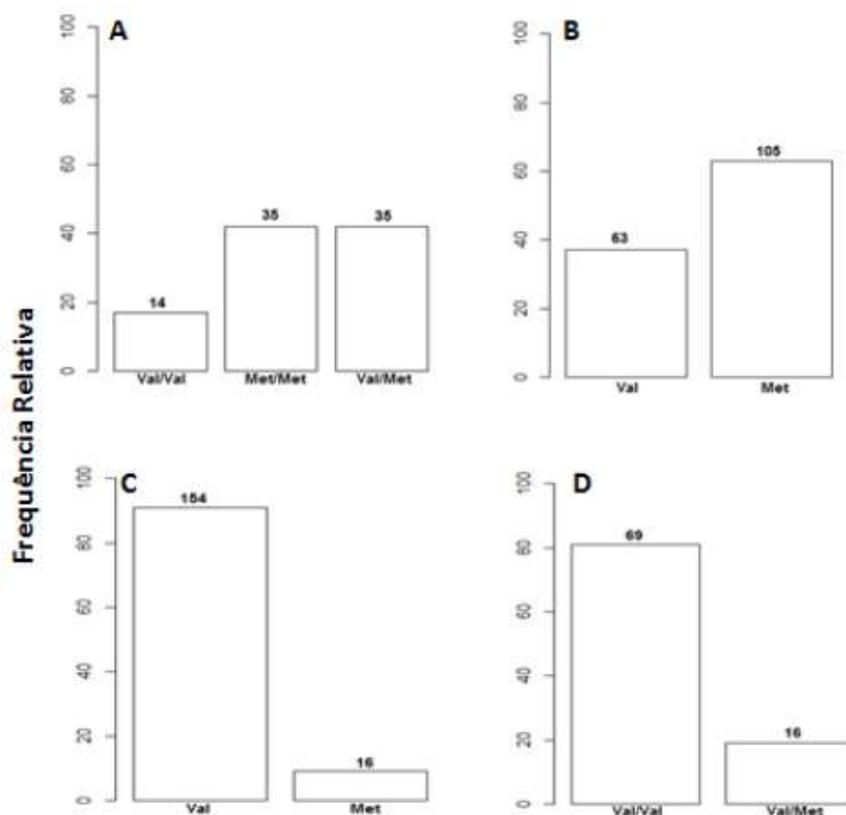


Figura 14 Cálculo das frequências genotípicas e alélicas para os loci multialélico e dialélico para os variantes no gene *DAT1*.

O cálculo de frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo Val158Met e Val66Met dos genes *COMT* e *BDNF* foram realizados considerando os *loci* bialélicos. Os genótipos Val/Met e Met/Met apresentaram 42% de frequência para o polimorfismo no gene *COMT*, enquanto ao genótipo Val/Val se apresentou com 17% do total da amostra (Figura 15). Já para o polimorfismo Val66Met, o genótipo Val/Val foi o mais frequente com 81% do total da amostra. O genótipo Val/Met o menos frequente, com 19%. O genótipo Met/Met não foi encontrado nessa amostra (Figura 15).



**Figura 15** Frequência alélica e genotípica para as variantes genéticas nos genes *COMT* e *BDNF*. Em A e B, a variante Val158Met teve suas frequências calculadas para uma maior prevalência do alelo Met. O genótipo selvagem Val/Val foi o menos presente na amostra. Em C e D, Nota-se a ausência do genótipo de risco Met/Met.

Com o intuito de observar qual estrutura genotípica melhor explicaria a diferenças entre os sintomas, modelos genotípicos foram construídos seguindo os modelos de codominância, dominância, recessividade e Log aditividade, se baseando nas dimensões de sintomas do TDAH, para desatenção, hiperatividade/impulsividade e perfil combinado dos sintomas.

Para a dimensão de desatenção o modelo que apresentou maior diferença entre as medias dos sintomas para o polimorfismo do gene *DRD4* foi o modelo de recessividade ( $p = 0,0015$ ), sendo que nesse modelo o alelo N7 mostrou-se estar relacionado com uma quantidade maior de sintomas de desatenção, com uma média de 7,29 e a estimativa de tamanho de efeito foi de  $r = 0,82$ . Para o polimorfismo no gene *DAT1*, o modelo de dominância apresentou uma maior diferença de médias, sendo 7,92 sintomas de desatenção para o genótipo 10/10, e 6,45 para a combinação dos N10/N10 e N10/10 ( $p = 0,002$ ). A estimativa do tamanho de efeito foi calculada para o modelo de dominância ( $r = 0,94$ ). Para os polimorfismos dos genes *COMT* e *BDNF* não houve diferenças significativas (Tabela 2).

Tabela 2 Modelos genéticos para os sintomas da dimensão de desatenção. O modelo de recessividade apresentou maior diferença para o polimorfismo do gene *DRD4*. Genótipos N7/N7 e N7/7 quando combinados apresentaram um media de 7,29 dos sintomas de desatenção, contra 4,85 para o genótipo homozigoto 7/7. ( $p=0,0015$ ). Para o polimorfismo no *DAT1*, o modelo de dominância apresentou maior diferença ,sendo 7,92 sintomas de desatenção para o genótipo 10/10, e 6,45 para a combinação dos N10/N10 e N10/10 ( $p= 0,002$ ). Não houve diferença para os polimorfismos nos genes *COMT* e *BDNF*.

Gene	Modelo	n	Média	Erro padrão	Diferença	Limite Inferior	Limite Superior	p valor
<b>DRD4</b>	Codominância							
	N7/N7	61	7,21	0,2231	0,00			<b>0,0040</b>
	7/N7	7	8,00	0,3780	0,78	-0,673	2,247	
	7/7	7	4,85	1,2234	-2,35	-3,816	-0,895	
	Dominância							
	N7/N7	61	7,21	0,2231	0,00			0,1849
	N7/7-7/7	14	6,42	0,7538	-0,78	-1,933	0,364	
	Recessivo							
	N7/N7-N7/7	68	7,29	0,2053	0,00			<b>0,0015</b>
7/7	7	4,85	1,2234	-2,43	-3,891	-0,983		
Log aditivo				-0,83	-1,539	-0,136	<b>0,0219</b>	
<b>DAT1</b>	Codominância							
	10/10	39	7,92	0,2447	0,00			<b>0,0003</b>
	N10/10	34	6,17	0,3544	-1,74	-2,555	-0,938	
	N10/N10	14	7,14	0,4041	-0,78	-1,853	0,292	
	Dominância							
	10/10	39	7,92	0,2447	0,00			<b>0,0002</b>
	N10/N10-N10/10	48	6,45	0,2824	-1,46	-2,216	-0,713	
	Recessivo							
	10/10-N10/10	73	7,11	0,2329	0,00			0,9528
N10/N10	14	7,14	0,4041	0,03	-1,067	1,133		
Log aditivo				-0,67	-1,218	-0,141	<b>0,0153</b>	
<b>COMT</b>	Codominância							
	Met/Met	35	6,80	0,3753	0,00			0,4614
	Val/Met	35	7,28	0,2972	0,48	-0,422	1,393	
	Val/Val	14	7,42	0,4156	0,62	-0,572	1,829	
	Dominância							
	Met/Met	35	6,80	0,3753	0,00			0,2204
	Val/Met-Val/Val	49	7,32	0,2411	0,52	-0,309	1,362	
	Recessividade							
	Met/Met-Val/Met	70	7,04	0,2394	0,00	0,498		
Val/Val	14	7,42	0,4156	0,38	-0,726	1,498		
Log aditivo				0,34	-0,222	0,919	0,2351	
<b>BDNF</b>	Codominância							
	Val/Val	69	7,17	0,2289	0,00			0,3040
	Val/Met	16	6,62	0,4905	-0,54	-1,589	0,491	
	Log Aditivo				-0,54	-1,589	0,491	

Não foram encontradas diferenças significativas para as médias dos sintomas de hiperatividade para nenhum dos modelos genéticos gerados (Tabela 3).

Tabela 3 Modelos genéticos para os sintomas da dimensão de hiperatividade. Não foi encontrado diferença significativa para nenhum dos modelos elaborados, para nenhum polimorfismo.

Gene	Modelo	n	Média	Erro padrão	Diferença	Limite Inferior	Limite Superior	p Valor
<b>DRD4</b>	Codominância							
	N7/N7	61	6,23	0,3624	0,00			0,8504
	7/N7	7	6,85	1,0562	0,62	-1,593	2,849	
	7/7	7	6,14	1,1218	-0,08	-2,307	2,134	
	Dominância							
	N7/N7	61	6,23	0,3624	0,00			0,7475
	N7/7- 7/7	14	6,50	0,7468	0,27	-1,369	1,911	
	Recessivo							
	N7/N7-N7/7	68	6,29	0,3411	0,00			0,8931
7/7	7	6,14	1,1218	-0,15	-2,349	2,047		
Log aditivo				0,07	-0,9536	1,099	0,8898	
<b>DAT1</b>	Codominância							
	10/10	39	6,48	0,4282	0,00			0,4479
	N10/10	34	6,26	0,4454	-0,22	-1,538	1,0932	
	N10/N10	14	5,357	1,0303	-1,13	-2,877	0,6170	
	Dominância							
	10/10	39	6,48	0,4282	0,00			0,4318
	N10/N10-N10/10	48	6,00	0,4335	-0,48	-1,696	0,7217	
	Recessivo							
	10/10N-10/10	73	6,38	0,3070	0,00			0,2198
N10/N10	14	5,35	1,0303	-1,02	-2,654	0,6011		
Log aditivo				-0,49	-1,317	0,3329	0,2457	
<b>COMT</b>	Codominância							
	Met/Met	35	13,17	0,6357	0,00			0,9722
	Val/Met	35	13,31	0,6022	0,14	-1,577	1,863	
	Val/Val	14	13,43	0,9929	0,25	-2,018	2,533	
	Dominância							
	Met/Met	35	13,17	0,6357	0,00			0,8285
	Val/Met-Val/Val	49	13,35	0,5097	0,17	-1,407	1,758	
	Recessividade							
	Met/Met-Val/Met	70	13,24	0,4347	0,00	0,862		0,8123
Val/Val	14	13,43	0,9929	0,18	-1,908	2,280		
Log aditivo				0,13	-0,949	1,213	0,6212	
<b>BDNF</b>	Codominância							
	Val/Val	69	6,27	0,3533	0,00			0,5645
	Val/Met	16	5,81	0,6597	-0,46	-2,031	1,105	
Log Aditivo				-0,4629	-2,031	1,105		

Os modelos gerados para a dimensão combinada dos sintomas do TDAH, desatenção e hiperatividade/impulsividade apresentaram diferença de média significativa apenas para o polimorfismo do gene *DAT1*, para os modelos de codominância ( $p = 0,0404$ ), dominância ( $p = 0,0110$ ) e log aditivo ( $p = 0,0268$ ). A estimativa do tamanho de efeito foi calculada para o modelo de dominância ( $r = 0,88$ ) (Tabela 4).

Tabela 4 Modelos genéticos para os sintomas da dimensão combinada. O modelo de dominância apresentou maior diferença para o polimorfismo do gene *DAT1*, sendo uma média de 14,41 sintomas combinados para o genótipo de risco 10/10 e 12,44 para a amostra N10/N10 e N10/10. Não houve diferença para os polimorfismos nos genes *DRD4*, *COMT* e *BDNF*.

Gene	Modelo	n	Média	Erro padrão	Diferença	Limite Inferior	Limite Superior	p Valor
<b>DRD4</b>	Codominância							
	N7/N7	61	13,44	0,4463	0,00			0,1167
	7/N7	7	14,86	1,3702	1,41	-1,344	4,1735	
	7/7	7	11,00	1,4475	-2,44	-5,202	0,3164	
	Dominância							
	N7/N7	61	13,44	0,4463	0,00			0,6317
	N7/7- 7/7	14	12,93	1,0968	-0,51	-2,607	1,5790	
	Recessivo							
	N7/N7-N7/7	68	13,59	0,4244	0,00			0,0686
7/7	7	11,00	1,4475	-2,58	-5,333	0,1563		
Log aditivo				-0,76	-2,064	0,5340	0,2521	
<b>DAT1</b>	Codominância							
	10/10	39	14,41	0,4979	0,00			<b>0,0404</b>
	N10/10	34	12,44	0,6048	-1,96	-3,582	-0,3562	
	N10/N10	14	12,50	1,1848	-1,91	-4,052	0,2315	
	Dominância							
	10/10	39	14,41	0,4979	0,00			<b>0,0110</b>
	N10/N10-N10/10	48	12,46	0,5433	-1,95	-3,425	-0,4787	
	Recessivo							
	10/10-N10/10	73	13,49	0,4017	0,00			0,3475
N10/N10	14	12,50	1,1848	-0,99	-3,054	1,0675		
Log aditivo				-1,17	-2,190	-0,1524	<b>0,0268</b>	
<b>COMT</b>	Codominância							
	Met/Met	35	13,17	0,6357	0,00			0,9722
	Val/Met	35	13,31	0,6022	0,14	-1,5774	1,863	
	Val/Val	14	13,43	0,9929	0,25	-2,0185	2,533	
	Dominância							
	Met/Met	35	13,17	0,6357	0,00			0,8285
	Val/Met-Val/Val	49	13,35	0,5097	0,17	-1,4075	1,758	
	Recessividade							
	Met/Met-Val/Met	70	13,24	0,4347	0,00			0,8624
Val/Val	14	13,43	0,9929	0,18	-1,9086	2,280		
Log aditivo				0,13	-0,9499	1,213	0,8123	
<b>BDNF</b>	Codominância							
	Val/Val	69	13,45	0,4426	0,00			0,3144
	Val/Met	16	12,44	0,8112	-1,01	-2,971	0,9473	
	Log Aditivo				-1,01	-2,971	0,9473	

A estimação dos efeitos individuais para a média de sintomas de desatenção indicou que os polimorfismos nos genes *DRD4* e *DAT1* foram significativos (Quadro 4) e o modelo explicou parte significativa da estrutura de variabilidade ( $R^2$  ajustado = 0,2229;  $n = 73$ ). O termo de interação entre estes dois polimorfismos não foi significativo neste modelo. Considerando os efeitos poligênicos dos quatro polimorfismos estudados, 0,48% dos sintomas de desatenção são explicados pelo modelo.

Quadro 4 Estimação dos efeitos individuais para a média de sintomas de desatenção. Polimorfismos nos genes *DRD4* e *DAT1* foram significativos. 22,29 % dos sintomas são explicados pelo modelo

Variáveis	Estimativa	DP	Estatística t	valor p
<b>Abordagem 1 (R<sup>2</sup> ajustado = 0,2229 ; n = 73)</b>				
intercepto	5,82	0,724	8,04	< 0,00001
DRD4 N7/N7 + N7/7	2,19	0,700	3,12	0,00257
DAT1 N10/N10 + N10/10	-1,35	0,409	-3,31	0,00146
<b>Abordagem 2(R<sup>2</sup> ajustado = 0,0048 ; n = 71)</b>				
intercepto	6.09	0,867	7.020	< 0,00001
Escore poligênico	0,22	0,191	1,158	0,251

Já os efeitos individuais para a média de sintomas de hiperatividade indicaram significância do polimorfismo do gene *DRD4* (Quadro 5) e o modelo não explicou a estrutura de variabilidade (R<sup>2</sup> ajustado = -0,012; n = 74). A estimativa dos sintomas de hiperatividade explicados pelo modelo poligênico foi negativa (R<sup>2</sup> ajustado = -0,027; n = 71)

Quadro 5 Estimação dos efeitos individuais para a média de sintomas de hiperatividade. Apenas o polimorfismo no gene *DRD4* foi significativo. A estimativa dos sintomas para o modelo individual foi negativa (R<sup>2</sup> = -0,012) A estimativa dos sintomas pelo modelo poligênico também foi negativa (R<sup>2</sup> = -0,027).

Variáveis	Estimativa	DP	Estatística t	valor p
<b>Abordagem 1 (R<sup>2</sup> ajustado = -0,012 ; n=74)</b>				
Intercepto	6,50	0,754	8,611	< 0,00001
DRD4 N7/N7 + N7/7	-2,705	0,837	-0,323	0,747
<b>Abordagem 2(R<sup>2</sup> ajustado = -0,027 ; n=71)</b>				
Intercepto	7,28	1,205	6,04	< 0,00001
Escore poligênico	-2,24	0,265	-0,898	0,372

Os efeitos individuais para a média de sintomas combinados indicou que os polimorfismos nos genes *DRD4* e *DAT1* também foram significativos (Quadro 6) e o modelo explicou parte da estrutura de variabilidade (R<sup>2</sup> ajustado = 0,0718; n = 73). O termo de interação entre estes dois polimorfismos não foi significativo neste modelo. A variância explicada pelo modelo poligênico para os sintomas combinados apresentou valor negativo (R<sup>2</sup> = -0,1425) (Quadro 6).

Quadro 5 Estimação dos efeitos individuais para a média de sintomas combinados. Polimorfismos nos genes *DRD4* e *DAT1* foram significativos. 7,18% dos sintomas são explicados pelo modelo. A estimativa dos sintomas combinados pelo modelo poligênico foi negativa.

Variáveis	Estimativa	DP	Estatística t	valor p
<b>Abordagem 1 (R<sup>2</sup> ajustado = 0,0718 ;n = 73)</b>				
Intercepto	12,17	1,426	8,53	< 0,00001
DRD4 N7/N7 + N7/7	2,85	1,38	1,657	0,1010
DAT1 N10/N10 + N10/10	-1,64	0,805	-2,04	0.0452
<b>Abordagem 2(R<sup>2</sup> ajustado = -0,1425 ;n = 71)</b>				
Intercepto	13,37	1,548	8,67	< 0,00001
Escore poligênico	-0,02	0,340	-0,05	0,961

Para avaliar a relação dos sintomas do TDAH à classe econômica, foi levada em consideração o critério CCEB, e a amostra caracterizada nas classes B2, C1, C2 e DE, como já descrito anteriormente. Não foi encontrada interação significativa entre genes e ambiente, considerando as classes econômicas do CCEB, e os sintomas nas 3 dimensões do TDAH, tanto analisando junto aos modelos genéticos individuais (Tabela 7), quanto utilizando o modelo poligênico (Tabela 8). 94,23% da variância dos sintomas de desatenção foi explicada pelo modelo individual (n = 66; R = 0,9423; p < 0,00001) e 92,22% foi explicado pelo poligênico (n = 64; R = 0,9222; p < 0,00001). Para os sintomas de hiperatividade e impulsividade, 84,68% da variância dos sintomas são explicados pelo modelo individual (n = 67; R = 0,8468; p < 0,00001) enquanto 84,50% são explicados pelo modelo poligênico (n = 64; R = 0,845 p < 0,00001). Considerando os sintomas combinados, 94,12% da variação dos sintomas são explicados pelo modelo individual (n = 66; R = 0,9412; p < 0,00001), enquanto 93,26% pelo modelo poligênico (n = 64; R = 0,9326; p < 0,00001) (Quadros 7 e 8).

Quadro 6 Modelo genético individual para as dimensões de sintomas do TDAH e as classes socioeconômicas segundo o CCEB.

<b>DESATENÇÃO (n=66 ; R<sup>2</sup>= 0,9423 ; p=&lt; 0,00001)</b>				
<b>Variáveis</b>	<b>Estimativa</b>	<b>DP</b>	<b>Estatística T</b>	<b>Valor p</b>
DRD4 7	6,06	0,941	6,44	< 0,00001
DRD4 N7	8,23	0,697	11,80	< 0,00001
DAT1N10	-1,49	0,433	-3,45	0,000961
CLASSE C1	0,17	0,740	0,23	0,815973
CLASSE C2	-0,58	0,841	-0,69	0,489234
CLASSE DE	-0,31	0,795	-0,39	0,695011

<b>HIPERATIVIDADE (n=67 ; R<sup>2</sup>=0,8468 ; p=&lt; 0,00001)</b>				
<b>Variáveis</b>	<b>Estimativa</b>	<b>DP</b>	<b>Estatística T</b>	<b>Valor p</b>
DRD4 7	5,54	1,189	4,66	< 0,00001
DRD4 N7	4,78	1,051	4,54	< 0,00001
CLASSE C1	1,64	1,125	1,46	0,148
CLASSE C2	1,61	1,288	1,25	0,215
CLASSE DE	1,56	1,221	1,28	0,205

<b>COMBINADO (n=66; R<sup>2</sup>= 0,9412 ; p=&lt; 0,00001)</b>				
<b>Variáveis</b>	<b>Estimativa</b>	<b>DP</b>	<b>Estatística T</b>	<b>Valor p</b>
DRD4 7	11,07	1,794	6,17	< 0,00001
DRD4 N7	13,39	1,330	10,06	< 0,00001
DAT1N10	-1,81	0,825	-2,19	0,0315
CLASSE C1	1,81	1,411	1,28	0,2034
CLASSE C2	0,99	1,603	0,62	0,5360
CLASSE DE	1,12	1,515	0,73	0,4623

Quadro 7 Modelo genético poligênico para as dimensões de sintomas do TDAH e as classes socioeconômicas segundo o CCEB.

<b>DESATENÇÃO (n = 64; R<sup>2</sup> = 0,9222 ; p &lt; 0,00001)</b>				
<b>Variáveis</b>	<b>Estimativa</b>	<b>DP</b>	<b>Estatística T</b>	<b>Valor p</b>
SCORE	0,29	0,204	1,44	0,153
<b>POLIGÊNICO</b>				
CLASSE B2	6,06	1,147	5,28	< 0,00001
CLASSE C1	5,99	0,968	6,19	< 0,00001
CLASSE C2	5,33	1,092	4,88	< 0,00001
CLASSE DE	5,60	1,007	5,56	< 0,00001
<b>HIPERATIVIDADE (n=64; R<sup>2</sup>= 0,845 p &lt; 0,00001)</b>				
<b>Variáveis</b>	<b>Estimativa</b>	<b>DP</b>	<b>Estatística T</b>	<b>Valor p</b>
SCORE	-0,41	0,268	-1,55	0,125
<b>POLIGÊNICO</b>				
CLASSE B2	6,72	1,509	4,45	< 0,00001
CLASSE C1	8,28	1,273	6,50	< 0,00001
CLASSE C2	8,46	1,437	5,88	< 0,00001
CLASSE DE	8,19	1,325	6,18	< 0,00001
<b>COMBINADO (n=64; R<sup>2</sup>= 0,9326 ; p &lt; 0,00001)</b>				
<b>Variáveis</b>	<b>Estimativa</b>	<b>DP</b>	<b>Estatística T</b>	<b>Valor p</b>
SCORE	-0,12	0,56	-0,34	0,733
<b>POLIGÊNICO</b>				
CLASSE B2	12,79	2,006	6,37	< 0,00001
CLASSE C1	14,27	1,692	8,43	< 0,00001
CLASSE C2	13,79	1,910	7,22	< 0,00001
CLASSE DE	13,80	1,762	7,83	< 0,00001

Para a confirmação da genotipagem, foi proposto o sequenciamento dos fragmentos correspondentes aos alelos 7R e 4R (*DRD4*) e alelos 10R e 9R (*DAT1*). Perdeu-se DNA na purificação do produto de PCR para o *DRD4* VNTR, e o sequenciamento dos fragmentos referentes aos alelos de 7 e 4 repetições (os mais frequentes) não foi bem sucedido. O resultado do sequenciamento do indivíduo homozigoto 10/10 apresentou 10 cópias de uma sequência intacta comum no VNTR de 40pb. Para os indivíduos homozigotos 9/9, detectou-se 9 cópias desta sequência.

## 5.DISSCUSSÃO

Este estudo contou com uma amostra de 87 indivíduos, todos diagnosticados com o TDAH, com ou sem comorbidades, com uma média de 9,47 anos de idade. Essa faixa etária se justifica por ser nessa idade em que a criança começa a apresentar dificuldades na escola, e o diagnóstico acaba sendo mais comum devido a orientação de professores<sup>5</sup>. Este trabalho faz parte de um projeto de avaliação multidimensional de indivíduos com TDAH conduzido pelo CTMM, onde o banco de dados conta com mais de 500 indivíduos atendidos pelo projeto. A amostra utilizada neste trabalho teve seu diagnóstico realizado utilizando o DSM-IV e o DMS-V, considerando o início do projeto em 2012, mas isso não causou diferenças de diagnóstico dentro os indivíduos da amostra, já que todas as crianças no estudo tiveram seus sintomas observados antes dos 12 anos. 81,60% da amostra é composta por indivíduos do sexo masculino, numa proporção de 3:1, o que corrobora a literatura<sup>7</sup>. Alguns estudos relatam também proporções de 2:1, mas sendo sempre a maioria do sexo masculino.

Os pacientes foram diagnosticados principalmente com o fenótipo combinado, e quando apresentando apenas uma dimensão, os sintomas de desatenção foram os mais prevalentes, com 71,04%. Os sintomas de hiperatividade são mais comuns na infância, ao passo que os sintomas de desatenção são mais frequentes na idade adulta<sup>9,12</sup>. Em totalidade, a apresentação dos sintomas de desatenção acaba por ser mais prevalente e prejudicial na idade escolar do que a hiperatividade. Este comportamento afeta não apenas a relação com outras crianças, como também o rendimento escolar, o que pode resultar em prejuízos na idade adulta, como dificuldade em relacionamentos, depressão e transtornos de ansiedade<sup>10,86</sup>.

A comorbidade do TDAH com o transtorno de oposição desafiante é comum na literatura, sendo observada na amostra desse estudo, no qual 66,67% das crianças diagnosticadas com TDAH apresentaram transtorno de oposição desafiante. Provavelmente isso se deve ao fato dos sintomas de hiperatividade e impulsividade terem associação com o comportamento desafiador<sup>10</sup>.

Consta na literatura inúmeros trabalhos envolvendo bases moleculares e genéticas ao TDAH, pois o transtorno reúne características que são herdáveis. As estimativas de prevalência do TDAH nos Estados Unidos são de 4%<sup>1,87</sup>. Estudos demonstram que a herdabilidade para o TDAH é superior a 70%, sem influência do ambiente compartilhado<sup>12</sup>. Contudo, por se tratar de um fenótipo multifatorial, a interferência do ambiente também se torna importante. Nesse trabalho, foram calculadas as frequências alélicas e genóticas para as variantes genéticas e, como esperado, as proporções encontradas para o polimorfismo no gene *DRD4* e no gene *DAT1* concordaram com a literatura, sendo que para o *DRD4*, o alelo mais frequente foi o de

4 repetições (73% da amostra), 4R, e o segundo mais frequente, o alelo de risco, com 7 repetições (14%) 7R<sup>49,88,89</sup>. Já para o gene *DAT1*, a literatura relata que o alelo de risco, com 10 repetições do VNTR de 40 pb, é o alelo mais abundante na população em geral, e o alelo 9R sendo o segundo mais comum<sup>90</sup>. Em concordância, neste estudo foi observada uma frequência de 64% para o alelo 10R do gene *DAT1*. Com relação aos polimorfismos nos genes *BDNF* e *COMT*, estes tiveram suas frequências alélicas calculadas para 91% de frequência para o alelo Val do polimorfismo Val/66/Met do gene *BDNF* e 62,5% para o alelo Met do polimorfismo Val158Met do gene *COMT*. O alelo Val do gene *BDNF* possui frequências relativamente bem menores na população se comparadas à frequência encontrada na amostra<sup>30</sup>. Uma possível explicação para isto se deve ao fato de que essas frequências sejam calculadas com amostras bem maiores e mais representativas da população, além de serem coletadas ao acaso, diferente da amostra do estudo, onde todos os indivíduos foram selecionados por apresentarem sintomas relacionados ao TDAH. O alelo Met para o polimorfismo Val158Met do gene *COMT* foi o mais frequente na amostra, com 62,5% de frequência. O genótipo Met/Met não foi encontrado para o polimorfismo Val66Met nessa amostra. Em humanos de origem caucasiana, estima-se que, entre 20% a 30% apresentem o genótipo heterozigoto, enquanto apenas entre 2% a 3% possuem genótipo homozigoto para o alelo Met, sendo frequência relativamente maior em asiáticos, entre 12 a 16%<sup>71</sup>.

Neste trabalho foram encontradas diferenças nas médias dos sintomas de desatenção e sintomas combinados, em relação as variantes nos genes *DRD4* e *DAT1*, sendo apresentada uma média maior dos sintomas de desatenção associados à ausência do alelo de risco 7R do gene *DRD4*. Para os sintomas combinados, o modelo genético de dominância foi o melhor modelo para o caso, apenas para a variante do gene *DAT1*. O Alelo 7R para o polimorfismo no *DRD4* já é bastante descrito em publicações sendo associado a sintomas de desatenção e à perfis de caráter exploratório, a chamada "busca pelo novo", relacionado a padrões de comportamento impulsivos<sup>91</sup>. Observou-se neste trabalho um padrão oposto ao esperado, já que o genótipo com a ausência do alelo 7R mostrou uma relação maior com o perfil desatento dos sintomas. A frequência do VNTR de 48pb do gene *DRD4* é bastante irregular em relação a diferentes grupos étnicos, variando muito as frequências alélicas entre as populações, além do fato de que outras variações estejam relacionadas ao mesmo padrão de comportamento, tendo por exemplo, associação com esses sintomas a presença do alelo 2R em populações asiáticas<sup>58,90</sup>.

Em relação ao polimorfismo do gene *DAT1*, o genótipo homozigoto para o alelo de risco (10/10) mostrou relação maior com os sintomas de desatenção do que os *loci*

com a ausência do alelo 10R, indicando o modelo genético de dominância como melhor modelo para o caso ( $p = 0,0002$ ). Para os sintomas isolados de hiperatividade/impulsividade, não houve diferenças significativas para nenhum modelo. O alelo 10R, além de ser o mais frequente, é considerado alelo de risco tanto para os sintomas desatentos, quanto impulsivos e de hiperatividade, possuindo o alelo 9R um efeito protetor, e o resultado observado nesse estudo confere com a literatura<sup>13,48,52</sup>. O VNTR de 40pb do gene *DAT1* possui frequência estável se comparado a outras populações, sendo o alelo 10R o mais comum nas populações, variando pouco em frequência<sup>52,90</sup>.

Parece existir uma maior associação de polimorfismos no gene *BDNF* nos sintomas da dimensão de desatenção do que no perfil de impulsividade hiperatividade de acordo com estudos publicados. Contudo, neste trabalho, não foi observada relação do polimorfismo Val66Met com nenhuma das três dimensões de sintomas do TDAH. Mesmo que em uma recente meta-análise não tenha sido observada associação direta do polimorfismo Val158Met no gene *COMT* e o TDAH, a enzima *COMT* parece desempenhar um papel importante na doença, pois alterações no seu funcionamento estaria associada a problemas sociais<sup>64,67</sup>. Assim, diversos trabalhos sugerem que o genótipo *Val/Val* possa predispor o indivíduo a uma maior suscetibilidade aos efeitos ambientais<sup>64,66,67</sup>. Não foram encontradas diferenças de medias de sintomas significativas para os polimorfismos dos genes *COMT* e *BDNF* para nenhuma das dimensões do TDAH nesse trabalho.

O desequilíbrio de ligação entre os genes *DRD4* e gene *BDNF* foi calculado para essa amostra considerando que ambos estão localizados no mesmo cromossomo. Um equilíbrio fraco foi calculado não indicando associação não aleatória entre os alelos. A intenção da verificação de desequilíbrio de ligação para essas duas variantes baseia-se na tentativa de compreensão no nível de independência entre essas duas variantes na população estudada, que poderiam explicar possíveis associações de uma delas em relação a frequência da outra, podendo apenas uma ser uma variável causal, contribuindo para a construção do fenótipo.

Todos os polimorfismos neste estudo encontraram-se de acordo com o equilíbrio de Hardy Weinberg, com exceção do VNTR de 48pb do gene *DRD4*. Segundo as definições do equilíbrio de Hardy Weinberg, as proporções genótípicas permanecem inalteradas e em equilíbrio entre as gerações caso não haja fatores evolutivos atuando, como casamentos consanguíneos, mutações, migrações, deriva genética e seleção natural.

Desvios no equilíbrio de Hardy Weinberg podem ocorrer quando os indivíduos são selecionados de populações diferentes e em tamanhos bem desiguais. Neste trabalho

não foi avaliada a origem étnica dos pacientes, embora tendo-se acesso aos dados de local de origem dos mesmos, sendo todos da região metropolitana de Belo Horizonte, com maioria oriunda de escola pública (68,96%). Problemas com erros no processo de genotipagem ou de viés de seleção também podem causar desvios no equilíbrio. O viés de seleção ocorre quando a seleção dos indivíduos participantes do estudo, seja com relação à base de exposição ou com relação à doença ou objeto de estudo dependem de um eixo de interesse.

A conformidade com equilíbrio de Hardy Weinberg para um locus sugere que vários fatores evolutivos tem suas condições cumpridas, incluindo a ausência de mutações recentes. Portanto, a hipótese sobre o viés de seleção parece ser mais plausível, pois toda a amostra foi coletada no mesmo hospital público. A atribuição à erros de genotipagem foi descartada, já que 10% da amostra foi genotipada aleatoriamente não sendo encontrada resultados conflitantes. Apesar disso, a existência de falsos homozigotos, devido a baixa eficiência de se identificar heterozigotos e com isso termos um viés relacionado a um numero maior e irreal de homozigotos pode contribuir para os desvios no equilíbrio.

Desvios no equilíbrio de Hardy Weinberg podem muitas vezes ser atribuídos à confirmação de associação de alguma variante a um determinado fenótipo. Caso a frequência de um polimorfismo genético seja consideravelmente maior do que a frequência esperada em um grupo estudado, o equilíbrio é violado por conta da diferença na frequência observada. Em caso de estudos de associação, é esperado o desvio em caso de relação significativa de uma variante. Diferente deste estudo, em estudos de caso controle, o cálculo de equilíbrio de Hardy Weinberg é realizado para a amostra com indivíduos caso e indivíduos controle separadas, e o desvio para o equilíbrio na primeira é plausível em caso afirmativo de associação<sup>92</sup>.

A estimativa dos efeitos individuais para a média de sintomas de desatenção indicou que os polimorfismos nos genes *DRD4* e *DAT1* foram significativos com o modelo explicando grande parte da estrutura de variabilidade. O mesmo observou-se para os sintomas de hiperatividade, mas apenas para a variante do gene *DRD4*. Os efeitos individuais para a média de sintomas combinados, assim como para os sintomas de desatenção, foi significativo para as variantes nos genes *DRD4* e *DAT1*. O termo de interação entre estes dois polimorfismos não foi significativa nesse modelo, tanto para os sintomas de desatenção quanto para os sintomas combinados. Entretanto, em um estudo de 2009, uma análise de regressão logística mostrou que a presença simultânea do genótipo 10/10 para o gene *DAT1* e o genótipo 7/7 para o gene *DRD4* proporciona maior susceptibilidade aos pacientes com TDAH com comorbidades como por exemplo ansiedade e depressão<sup>93</sup>. Em um estudo de caso controle, foi

demonstrado uma associação da combinação do genótipo com a presença do alelo 7R do *DRD4* com o genótipo homozigoto 10/10 do gene *DAT1* com pacientes diagnosticados com TDAH<sup>94</sup>.

Considerando os efeitos poligênicos dos quatro polimorfismos estudados, a variação dos sintomas é bem explicada pelos modelos, embora os modelos individuais sejam mais interessantes para explicar a variação, já que os polimorfismos nos genes *BDNF* e *COMT* não apresentaram influência significativa em um modelo individual, e o efeito do modelo poligênico pode se explicar pelo efeito das variantes dos genes *DRD4* e *DAT1*.

Além disso, com o modelo poligênico, a genotipagem dos quatro polimorfismos é necessária, causando um gasto maior de tempo e dinheiro. Pode-se atribuir o efeito menor observado no modelo poligênico à ausência de influência significativa dos polimorfismos Val158Met e Val66Met, e essa tendência é observada na diminuição do valor do R<sup>2</sup> ajustado. A genotipagem das variantes no *DRD4* e *DAT1* poderia ser interessante para a clínica, e o mesmo se aplica para o perfil combinado dos sintomas. A utilização do CCEB como critério de classe social para este estudo baseia-se no fato do mesmo se tratar de um critério de classificação econômica comum, e por unificar os mecanismos de avaliação dos potenciais de compra. Este trabalho não identificou relação significativa entre a manifestação dos sintomas de desatenção e hiperatividade e as classes econômicas, sendo que a variação se altera bem pouco entre as classes. Contudo, polimorfismos no gene *BDNF* e *COMT* estão relacionados com resposta a estímulos ambientais. Variantes no *BDNF* já foram associados com a manifestação nos sintomas desatentos relacionando as classes econômicas de acordo com o SES (*The Office on Socioeconomic Status*)<sup>38,69</sup>.

Este estudo não observou significância na interação gene x ambiente nos dois modelos, tanto avaliando junto aos efeitos individuais quanto poligênicos. Junto ao modelo poligênico, observou-se significância das classes aos sintomas das 3 dimensões, excluindo participação do modelo genético baseado no modelo contínuo de alelos de risco do score poligênico. No modelo de interação com genótipos individuais, nenhuma significância foi observada para as classes, sendo significativa a participação dos polimorfismos nos genes *DRD4* e *DAT1*.

Embora sendo encontrados resultados significativos, algumas limitações nessa pesquisa devem ser levadas em consideração. Uma amostra maior poderia ser usada, considerando o fato de que o transtorno estudado ter uma prevalência considerável na infância. Uma exploração maior de polimorfismos nesses quatro genes estudados neste trabalho seria de grande ajuda para a compressão da contribuição molecular para a manifestação do TDAH, tratando-se de um transtorno multifatorial, em que uma

abordagem continua dos sintomas torna-se necessária ao se trabalhar com comportamento<sup>13</sup>.

Uma possível explicação para as diferenças de observação na amostra em relação as frequências alélicas baseiam-se no fato da amostra possuir um viés de seleção considerável, já que a amostra foi coletada em um hospital público e a maioria dos pacientes pertencerem a classes media/baixa e baixa, com uma frequência de 74,7%, o que poderia interferir na distribuição da amostra, por existir no Brasil uma alta relação de grupos étnicos específicos e classes sociais. Juntamente a isso, o fato do polimorfismo do gene *DRD4* possuir alta variabilidade em comparação com diferentes populações é um fator a ser considerado, já que apenas esse polimorfismo apresentou desvios no equilíbrio<sup>49,57,93</sup>. As frequências alélicas para a variante do gene *DRD4* em populações africanas são diferentes da Europeia e asiática, e a altíssima ancestralidade africana observada na amostra pode também explicar os desvios no equilíbrio<sup>95</sup>.

Dado o exposto, considerando-se a prevalência do TDAH na infância e o altíssimo prejuízo que ele tem causado na vida dos pacientes, seria interessante a continuação do estudo com outros polimorfismos associados à doença, assim como a replicação do mesmo trabalho em uma amostra maior, objetivando um melhor entendimento da funcionalidade do TDAH e suas possíveis implicações terapêuticas.

## **5.CONCLUSÃO**

Este trabalho indicou que as variantes analisadas dos genes *DRD4* e *DAT1* apresentaram relação com a intensidade dos sintomas do TDAH enquanto não foram encontradas relação para os polimorfismos do genes *COMT* e *BDNF*. A interação gênica não foi observada de maneira independente bem como a interação gene x ambiente. Estudos futuros são necessários a fim de avaliar as associações apresentadas neste estudo bem como explorar outras associações que possam colaborar com a predição e compreensão de sintomas em pacientes com TDAH.

## 6.REFERÊNCIAS

1. Kiely, B. & Adesman, A. What we do not know about ADHD... yet. *Curr. Opin. Pediatr.* **27**, 395–404 (2015).
2. Thomas, R., Sanders, S., Doust, J., Beller, E. & Glasziou, P. Prevalence of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Systematic Review and Meta-analysis. *Pediatrics* **135**, (2015).
3. Kooij, S. J. J. *et al.* European consensus statement on diagnosis and treatment of adult ADHD: The European Network Adult ADHD. *BMC Psychiatry* **10**, 67 (2010).
4. *Apa. Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - DSM-5.* (2014). doi:10.11769780890425596
5. Klein, B., Damiani-Taraba, G., Koster, A., Campbell, J. & Scholz, C. Diagnosing attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) in children involved with child protection services: Are current diagnostic guidelines acceptable for vulnerable populations? *Child. Care. Health Dev.* **41**, 178–185 (2015).
6. Sridhar, C., Bhat, S., Acharya, U. R., Adeli, H. & Bairy, G. M. Diagnosis of attention deficit hyperactivity disorder using imaging and signal processing techniques. *Comput. Biol. Med.* **88**, 93–99 (2017).
7. Siegel, C. E., Laska, E. M., Wanderling, J. a, Hernandez, J. C. & Levenson, R. B. Prevalence and diagnosis rates of childhood ADHD among racial-ethnic groups in a public mental health system. *Psychiatr. Serv.* **67**, 199–205 (2016).
8. Zhu, Y., Liu, W., Li, Y., Wang, X. & Winterstein, A. G. Prevalence of ADHD in Publicly Insured Adults. *J. Atten. Disord.* 108705471769881 (2017). doi:10.1177/1087054717698815
9. P., A., W., C., B., C. & E., T. Adult attention-deficit hyperactivity disorder: Recognition and treatment in general adult psychiatry. 8–10 (2007). doi:10.1192/bjp.bp.106.026484
10. Reale, L. *et al.* Comorbidity prevalence and treatment outcome in children and adolescents with ADHD · on behalf of Lombardy ADHD Group. *Eur Child Adolesc Psychiatry* (2017). doi:10.1007/s00787-017-1005-z
11. Aebi, M. *et al.* Gene-set and multivariate genome-wide association analysis of oppositional defiant behavior subtypes in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* **171**, 573–588 (2016).
12. Efron, D., Bryson, H., Lycett, K. & Sciberras, E. Children referred for evaluation for ADHD: comorbidity profiles and characteristics associated with a positive diagnosis. *Child. Care. Health Dev.* **42**, 718–724 (2016).
13. Gizer, I. R., Ficks, C. & Waldman, I. D. Candidate gene studies of ADHD: A

- meta-analytic review. *Hum. Genet.* **126**, 51–90 (2009).
14. Soleimani, R. The Impact of Methylphenidate on Motor Performance in Children with both Attention Deficit Hyperactivity Disorder and Developmental Coordination Disorder : A Randomized Double- Blind Crossover Clinical Trial. **42**, 1–8 (2017).
  15. Cortese, S. *et al.* Association between symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder and bulimic behaviors in a clinical sample of severely obese adolescents. *Int. J. Obes.* **31**, 340–6 (2007).
  16. Rohde, L. A. *et al.* Dopamine transporter gene, response to methylphenidate and cerebral blood flow in attention-deficit/hyperactivity disorder: a pilot study. *Synapse* **48**, 87–9 (2003).
  17. Ding, K. *et al.* DAT1 methylation is associated with methylphenidate response on oppositional and hyperactive-impulsive symptoms in children and adolescents with ADHD. *World J. Biol. Psychiatry* **0**, 1–9 (2016).
  18. van der Schans, J. *et al.* Methylphenidate use and school performance among primary school children: a descriptive study. *BMC Psychiatry* **17**, 116 (2017).
  19. Shekim, W. O., Asarnow, R. F., Hess, E., Zauha, K. & Wheeler, N. A clinical and demographic profile of a sample of adults with attention deficit hyperactivity disorder, residual state. *Compr. Psychiatry* **31**, 416–425 (1990).
  20. J., B., S.V., F., K., K. & M.T., T. Evidence of familial association between attention deficit disorder and major affective disorders. **2114**, (1991).
  21. Sigfusdottir, I. D. *et al.* An epidemiological study of ADHD and conduct disorder: does family conflict moderate the association? *Soc. Psychiatry Psychiatr. Epidemiol.* **0**, 0 (2017).
  22. Zhou, F. *et al.* Dietary, nutrient patterns and blood essential elements in chinese children with ADHD. *Nutrients* **8**, 1–14 (2016).
  23. Pelsser, L. M., Frankena, K., Toorman, J. & Rodrigues Pereira, R. Diet and ADHD, Reviewing the Evidence: A Systematic Review of Meta-Analyses of Double-Blind Placebo-Controlled Trials Evaluating the Efficacy of Diet Interventions on the Behavior of Children with ADHD. *PLoS One* **12**, e0169277 (2017).
  24. Kandel, Eric R., Schwartz, James H., Jessell, Thomas M., Siegelbaum, Steven A., Hudspeth, A. J. Principles of neural science. 1–1531 (2013).
  25. Nagatsu, T. & Nagatsu, I. Tyrosine hydroxylase (TH), its cofactor tetrahydrobiopterin (BH4), other catecholamine-related enzymes, and their human genes in relation to the drug and gene therapies of Parkinson???'s disease (PD): historical overview and future prospects. *J. Neural Transm.* **123**,

- 1255–1278 (2016).
26. Cheng, W., Ka, Y.-W. & Chang, C.-C. Involvement of dopamine beta-hydroxylase in the neuroendocrine-immune regulatory network of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* **68**, 92–101 (2017).
  27. Tseng, H.-H. *et al.* Dopamine transporter availability in drug-naïve patients with schizophrenia and later psychotic symptoms severity. *Schizophr. Res.* 2–3 (2017). doi:10.1016/j.schres.2017.03.036
  28. Lundwall, R. A. & Rasmussen, C. G. MAOA Influences the Trajectory of Attentional Development. *Front. Hum. Neurosci.* **10**, 1–15 (2016).
  29. Gu, F., Chauhan, V. & Chauhan, A. Monoamine oxidase-A and B activities in the cerebellum and frontal cortex of children and young adults with autism. *J. Neurosci. Res.* **0**, (2017).
  30. Meira-Lima, I. *et al.* Association analysis of the catechol-o-methyltransferase (COMT), serotonin transporter (5-HTT) and serotonin 2A receptor (5HT2A) gene polymorphisms with obsessive-compulsive disorder. *Genes, Brain Behav.* **3**, 75–79 (2004).
  31. Beaulieu, J. M., Espinoza, S. & Gainetdinov, R. R. Dopamine receptors - IUPHAR review 13. *Br. J. Pharmacol.* **172**, 1–23 (2015).
  32. Siahposht-Khachaki, a., Pourreza, P., Ezzatpanah, S. & Haghparast, a. Nucleus accumbens dopamine receptors mediate hypothalamus-induced antinociception in the rat formalin test. *Eur. J. Pain* 1–10 (2017). doi:10.1002/ejp.1029
  33. Vyas, N. S. *et al.* D2/D3 dopamine receptor binding with [F-18]fallypride correlates of executive function in medication-naïve patients with schizophrenia. *Schizophr. Res.* (2016). doi:10.1016/j.schres.2017.05.017
  34. Robinson, B. G. *et al.* Desensitized D2 autoreceptors are resistant to trafficking. *Sci. Rep.* **7**, 4379 (2017).
  35. Su, Y.-W. *et al.* Roles of Neurotrophins in Skeletal Tissue Formation and Healing. *J. Cell. Physiol.* (2017). doi:10.1002/jcp.25936
  36. Jiang, R. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met polymorphism interacts with gender to influence cortisol responses to mental stress. *Psychoneuroendocrinology* **79**, 13–19 (2017).
  37. Kowiański, P. *et al.* BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cell. Mol. Neurobiol.* 1–15 (2017). doi:10.1007/s10571-017-0510-4
  38. Cubero-Millán, I. *et al.* BDNF concentrations and daily fluctuations differ among ADHD children and respond differently to methylphenidate with no relationship

- with depressive symptomatology. *Psychopharmacology (Berl)*. (2016).  
doi:10.1007/s00213-016-4460-1
39. Koshy, G., Delpisheh, A. & Brabin, B. J. Childhood obesity and parental smoking as risk factors for childhood ADHD in Liverpool children. *ADHD Atten. Deficit Hyperact. Disord.* **3**, 21–28 (2011).
  40. Turic, D., Swanson, J. & Sonuga-Barke, E. DRD4 and DAT1 in ADHD: Functional neurobiology to pharmacogenetics. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine* **3**, 61–78 (2010).
  41. Agrawal, A. *et al.* The effects of maternal smoking during pregnancy on offspring outcomes. *Prev. Med. (Baltim)*. **50**, 13–18 (2010).
  42. Takase, M. *et al.* The impacts of dopamine D2 receptor polymorphism and antipsychotic dosage on dopamine supersensitivity psychosis in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 14–15 (2017). doi:10.1016/j.schres.2017.03.014
  43. Reguilón, M. D. *et al.* Dopamine D 2 receptors mediate the increase in reinstatement of the conditioned rewarding effects of cocaine induced by acute social defeat. *Eur. J. Pharmacol.* **799**, 48–57 (2017).
  44. Forero, D. a., Lopez-Leon, S., Shin, H. D., Park, B. L. & Kim, D. J. Meta-analysis of six genes (BDNF, DRD1, DRD3, DRD4, GRIN2B and MAOA) involved in neuroplasticity and the risk for alcohol dependence. *Drug Alcohol Depend.* **149**, 259–263 (2015).
  45. SCHMITZ, M. *et al.* Smoking During Pregnancy and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder, Predominantly Inattentive Type: A Case-Control Study. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* **45**, 1338–1345 (2006).
  46. Hamza, M. *et al.* Epigenetics and ADHD. *J. Atten. Disord.* 108705471769676 (2017). doi:10.1177/1087054717696769
  47. Franke, B. *et al.* The genetics of attention deficit/hyperactivity disorder in adults, a review. *Mol. Psychiatry* **17**, 960–987 (2012).
  48. Agudelo, J. a *et al.* Evidence of an association between 10/10 genotype of DAT1 and endophenotypes of attention deficit/hyperactivity disorder. *Neurologia* **30**, 1–7 (2015).
  49. Martel, M. M. *et al.* The dopamine receptor D4 gene (DRD4) moderates family environmental effects on ADHD. *J. Abnorm. Child Psychol.* **39**, 1–10 (2011).
  50. Weiss, R. E., Stein, M. A., Duck, S. C., Chyna, B. & Phillips, W. Low intelligence but not attention deficit hyperactivity disorder is associated with resistance to thyroid hormone caused by mutation R316H in the thyroid hormone receptor b gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **78**, 1525–1528 (1994).
  51. Albrecht, B. *et al.* Genetics of preparation and response control in ADHD: The

- role of DRD4 and DAT1. *J. Child Psychol. Psychiatry Allied Discip.* **55**, 914–923 (2014).
52. Šerý, O. *et al.* A 40-bp VNTR polymorphism in the 3'-untranslated region of DAT1/SLC6A3 is associated with ADHD but not with alcoholism. *Behav. Brain Funct.* **11**, 21 (2015).
  53. Jin, J. *et al.* The divergent impact of COMT Val158Met on executive function in children with and without attention-deficit/hyperactivity disorder. *Genes, Brain Behav.* **15**, 271–279 (2016).
  54. Fliers, E. *a et al.* Genome-wide association study of motor coordination problems in ADHD identifies genes for brain and muscle function. *World J. Biol. Psychiatry* **13**, 211–222 (2012).
  55. Turner, M., Galloway, A. & Vigorito, E. Noncoding RNA and its associated proteins as regulatory elements of the immune system. *Nat. Immunol.* **15**, 484–491 (2014).
  56. ElBaz Mohamed, F., Kamal, T. M., Zahra, S. S., Khfagy, M. A. H. & Youssef, A. M. Dopamine D4 Receptor Gene Polymorphism in a Sample of Egyptian Children With Attention-Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD). *J. Child Neurol.* (2016). doi:10.1177/0883073816674091
  57. Nikolaidis, A. & Gray, J. R. ADHD and the DRD4 exon III 7-repeat polymorphism: An international meta-analysis. *Soc. Cogn. Affect. Neurosci.* **5**, 188–193 (2009).
  58. Leung, P. W. *et al.* Family-based association study of DRD4 gene in methylphenidate-responded Attention Deficit/Hyperactivity Disorder. *PLoS One* **12**, e0173748 (2017).
  59. Prasad, P., Ambekar, A. & Vaswani, M. Case – control association analysis of Dopamine receptor polymorphisms in alcohol dependence : a pilot study in Indian males. *BMC Res. Notes* 1–6 (2013).
  60. Yoshii, F., Ryo, M., Baba, Y., Koide, T. & Hashimoto, J. Journal of the Neurological Sciences Combined use of dopamine transporter imaging ( DAT-SPECT ) and I-metaiodobenzylguanidine ( MIBG ) myocardial scintigraphy for diagnosing Parkinson <sup>TM</sup> s disease. *J. Neurol. Sci.* **375**, 80–85 (2017).
  61. Tong, J. H. S. *et al.* An association between a dopamine transporter gene (SLC6A3) haplotype and ADHD symptom measures in nonclinical adults. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* **168**, 89–96 (2015).
  62. Cook, E. H. *et al.* Association of attention-deficit disorder and the dopamine transporter gene. *Am. J. Hum. Genet.* **56**, 993–8 (1995).
  63. Roman, T., Rohde, L. A. & Hutz, M. H. Polymorphisms of the dopamine

- transporter gene: influence on response to methylphenidate in attention deficit-hyperactivity disorder . *Am J Pharmacogenomics* **4**, 83–92 (2004).
64. Hosang, G. M., Fisher, H. L., Cohen-Woods, S., McGuffin, P. & Farmer, A. E. Stressful life events and catechol-O-methyl-transferase ( *COMT* ) gene in bipolar disorder. *Depress. Anxiety* 1–8 (2017). doi:10.1002/da.22606
  65. Matthews, N. *et al.* The *COMT* Val158 allele is associated with impaired delayed-match-to-sample performance in ADHD. *Behav. Brain Funct.* **8**, 25 (2012).
  66. Van Goozen, S. H. M. *et al.* Identifying mechanisms that underlie links between *COMT* genotype and aggression in male adolescents with ADHD. *J. Child Psychol. Psychiatry Allied Discip.* **57**, 472–480 (2016).
  67. Lee, Y. H. & Song, G. G. BDNF 196 G/A and *COMT* Val158Met Polymorphisms and Susceptibility to ADHD: A Meta-Analysis. *J. Atten. Disord.* (2015). doi:10.1177/1087054715570389
  68. Elia, J. *et al.* Candidate gene analysis in an on-going genome-wide association study of attention-deficit hyperactivity disorder: suggestive association signals in *ADRA1A*. *Psychiatr. Genet.* **19**, 134–41 (2009).
  69. Lasky-Su, J. *et al.* A study of how socioeconomic status moderates the relationship between SNPs encompassing BDNF and ADHD symptom counts in ADHD families. *Behav. Genet.* **37**, 487–497 (2007).
  70. Ozturk, O. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor gene val66met polymorphism is a risk factor for attention-deficit hyperactivity disorder in a Turkish sample. *Psychiatry Investig.* **13**, 518–525 (2016).
  71. Shimizu, E., Hashimoto, K. & Iyo, M. Ethnic difference of the BDNF 196G/A (val66met) polymorphism frequencies: the possibility to explain ethnic mental traits. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* **126B**, 122–123 (2004).
  72. Kieling, C., Roman, T., Doyle, A. E., Hutz, M. H. & Rohde, L. A. Association between *DRD4* Gene and Performance of Children with ADHD in a Test of Sustained Attention. *Biol. Psychiatry* **60**, 1163–1165 (2006).
  73. Polanczyk, G. *et al.* Attention-deficit/hyperactivity disorder: advancing on pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* **6**, 225–34 (2005).
  74. Roman, T. *et al.* Further evidence for the association between attention-deficit/hyperactivity disorder and the dopamine-??-hydroxylase gene. *Am. J. Med. Genet. - Neuropsychiatr. Genet.* **114**, 154–158 (2002).
  75. Roman, T. *et al.* Is the alpha-2A adrenergic receptor gene (*ADRA2A*) associated with attention-deficit/hyperactivity disorder? *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* **120B**, 116–120 (2003).

76. Costa, D. de S. *et al.* Telomere length is highly inherited and associated with hyperactivity-impulsivity in children with attention deficit/hyperactivity disorder. *Front. Mol. Neurosci.* **8**, 1–8 (2015).
77. Roman, T. *et al.* 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 (2001).
78. Genro, J. P. *et al.* 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.* **144B**, 215–219 (2007).
79. Genro, J. P. *et al.* No association between dopaminergic polymorphisms and intelligence variability in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol. Psychiatry* **11**, 1066–7 (2006).
80. Schmitz, M. *et al.* Association Between Alpha-2a-adrenergic Receptor Gene and ADHD Inattentive Type. *Biol. Psychiatry* **60**, 1028–1033 (2006).
81. Szobot, C. *et al.* Brain perfusion and dopaminergic genes in boys with attention-deficit/ hyperactivity disorder. *Am. J. Med. Genet. - Neuropsychiatr. Genet.* **132 B**, 53–58 (2005).
82. Article, O. *et al.* Association of the adrenergic alpha2A receptor gene with methylphenidate improvement of inattentive symptoms in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* **64**, 218–224 (2007).
83. Zeni, C. P. *et al.* No significant association between response to methylphenidate and genes of the dopaminergic and serotonergic systems in a sample of Brazilian children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* **144**, 391–394 (2007).
84. Ariza, M. *et al.* Dopamine genes (DRD2/ANKK1-TaqA1 and DRD4-7R) and executive function: Their interaction with obesity. *PLoS One* **7**, (2012).
85. Fernández-Jaén, A. *et al.* Cingulate Cortical Thickness and Dopamine Transporter (DAT1) Genotype in Children and Adolescents With ADHD. *J. Atten. Disord.* (2016). doi:10.1177/1087054716647483
86. Telman, L. G. E., van Steensel, F. J. a., Maric, M. & Bögels, S. M. Are Anxiety Disorders in Children and Adolescents Less Impairing Than ADHD and Autism Spectrum Disorders? Associations with Child Quality of Life and Parental Stress and Psychopathology. *Child Psychiatry Hum. Dev.* **0**, 0 (2017).
87. Faraone, S. V, Sergeant, J., Gillberg, C. & Biederman, J. The worldwide prevalence of ADHD: is it an American condition? *World Psychiatry* **2**, 104–113

- (2003).
88. Chang, F. M., Kidd, J. R., Livak, K. J., Pakstis, a. J. & Kidd, K. K. The world-wide distribution of allele frequencies at the human dopamine D4 receptor locus. *Hum. Genet.* **98**, 91–101 (1996).
  89. Smith, H. J. *et al.* Parenting and Child DRD4 Genotype Interact to Predict Children's Early Emerging Effortful Control. *Child Dev.* **83**, 1932–1944 (2012).
  90. Haberstick, B. C. *et al.* Simple sequence repeats in the National Longitudinal Study of Adolescent Health: An ethnically diverse resource for denetic analysis of health and behavior. *Behavior* **44**, 487–497 (2014).
  91. Strobel, a, Lesch, K. P., Jatzke, S., Paetzold, F. & Brocke, B. Further evidence for a modulation of Novelty Seeking by DRD4 exon III, 5-HTTLPR, and COMT val/met variants. *Mol. Psychiatry* **8**, 371–372 (2003).
  92. Salanti, G., Amountza, G., Ntzani, E. E. & Ioannidis, J. P. a. Hardy-Weinberg equilibrium in genetic association studies: an empirical evaluation of reporting, deviations, and power. *Eur. J. Hum. Genet.* **13**, 840–848 (2005).
  93. Gabriela, M. L. *et al.* Genetic interaction analysis for DRD4 and DAT1 genes in a group of Mexican ADHD patients. *Neurosci. Lett.* **451**, 257–260 (2009).
  94. Carrasco, X. *et al.* Genotypic interaction between DRD4 and DAT1 loci is a high risk factor for attention-deficit/hyperactivity disorder in Chilean families. *Am. J. Med. Genet. - Neuropsychiatr. Genet.* **141 B**, 51–54 (2006).
  95. Matthews, L. J. & Butler, P. M. Novelty-seeking DRD4 polymorphisms are associated with human migration distance out-of-Africa after controlling for neutral population gene structure. *Am. J. Phys. Anthropol.* **145**, 382–389 (2011).

## 7.ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE –02899412.9.0000.5149

Interessado(a): Profa. Débora Marques de Miranda  
Departamento de Saúde Mental  
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 03 de outubro de 2012, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação multidimensional de indivíduos com transtorno de déficit de atenção e hiperatividade**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral**  
**Coordenadora do COEP-UFMG**