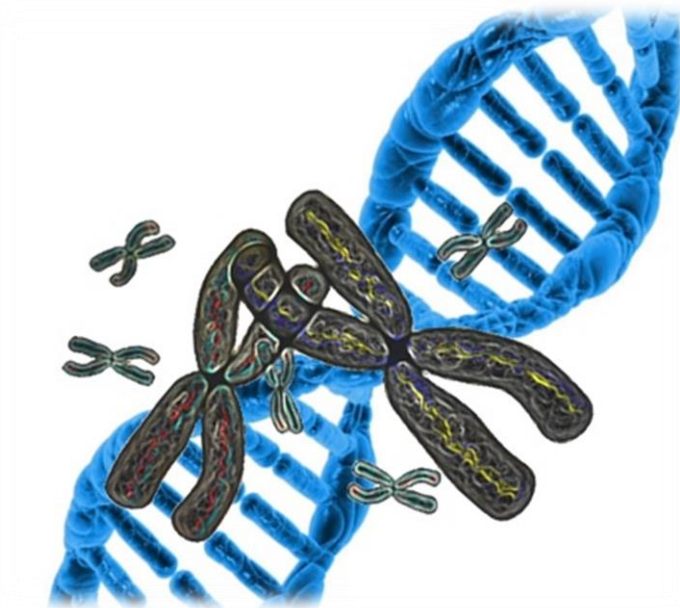




DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Genes Candidatos para a Perturbação do Défice de Atenção e Hiperatividade na população portuguesa: Sistema Neurotrófico



Mafalda Sofia Dias Pimenta Patrício

2015



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Genes Candidatos para a Perturbação do Défice de Atenção e Hiperatividade na população portuguesa: Sistema Neurotrófico

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Alda Maria de Abreu Cardoso da Faculdade de Medicina (Universidade de Coimbra) e co-orientação do Professor Doutor António Manuel Santos Carriço Portugal do Departamento Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia (Universidade de Coimbra).

Mafalda Sofia Dias Pimenta Patrício

2015

Resultados Preliminares deste estudo foram apresentados sob a forma de *poster*, o qual foi premiado com uma *Menção Honrosa*.

Mafalda Patrício, José Boavida, Susana Nogueira, Cláudia Alfaiate, Margarida Almeida, Alda Maria Cardoso. Genética da PHDA: Genes do Sistema Neurotrófico. *Poster* apresentado no 5º Simpósio da Perturbação da Hiperatividade e Défice de Atenção, Coimbra, Portugal, 16 e 17 de Abril 2015.

Agradecimentos

Agradeço à Professora Doutora Alda Cardoso, por todo o seu apoio, disponibilidade, ajuda e orientação ao longo deste trabalho.

Ao Professor Doutor António Portugal pela sua disponibilidade e ajuda na realização deste projeto.

Ao Instituto de Medicina Legal e Ciências Forenses e à Unidade de Genética Clínica e Molecular pela possibilidade de realizar este trabalho.

Às famílias que aceitaram participar de forma voluntária neste estudo.

Ao Centro de Desenvolvimento da Criança do Hospital Pediátrico de Coimbra, particularmente aos Doutores José Boavida, Margarida Almeida, Cláudia Alfaiate e Susana Nogueira que selecionaram as famílias para que fosse possível realizar este trabalho.

Aos meus pais, João Paulo e Isabel, por sempre acreditarem em mim e por todo o apoio, amor e carinho que me deram.

Aos meus avós e tios-avós por estarem sempre presentes e por nunca deixarem de me apoiar. Sem dúvida que foram e são como verdadeiros pais para mim.

Aos meus irmãos por todos os momentos que passamos juntos e por todo o carinho que me deram. Agradeço ainda à Elisabete, ao António, à Helena, ao João e ao Bruno, por toda a amizade e ajuda demonstrada ao longo deste percurso.

Aos meus tios por estarem sempre dispostos a ajudar-me e por acreditarem que este trabalho seria possível.

Agradeço às minhas colegas de curso, Catarina, Patrícia, Daniela Costa e Daniela Ferreira, por toda a amizade e carinho e por todos os momentos que passamos juntas. Agradeço de forma especial à Katia e ao André por nunca me deixarem só e por estarem sempre presentes.

À Márcia e à Sofia por toda a ajuda, orientação e por tudo o que me ensinaram.

Ao meu João, um agradecimento especial por todo o seu carinho, apoio, ajuda, paciência e amor incondicional. Sem ele este trabalho não seria possível.

Agradeço também a todos os restantes amigos e família que estiveram presentes e que me apoiaram na realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que indiretamente permitiram a realização deste estudo.

Resumo

A Perturbação do Défice de Atenção e Hiperatividade (PDAH) é a doença neuropsiquiátrica mais comum nas faixas etárias mais baixas e apresenta repercussões nos diversos níveis sociais, familiares e económicos. A PDAH caracteriza-se por sintomas de hiperatividade, impulsividade e falta de atenção, e subdivide-se em três subtipos, o inatento, o hiperativo-impulsivo e o misto. Várias evidências sugerem que o sistema neurotrófico, particularmente o BDNF e o recetor $p75^{NTR}$, desempenham um papel importante na etiologia da PDAH. Na população portuguesa não existem estudos genéticos relacionados com o sistema neurotrófico. Neste trabalho investigou-se os polimorfismos Val66Met do gene *BDNF* e S205L do gene *p75^{NTR}* na etiologia da PDAH e procedeu-se também à análise de género e subtipos da patologia, na população portuguesa, utilizando a metodologia PCR-RFLP.

Através das estratégias HRR e TDT não se obteve associação entre o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* e a PDAH na amostra total de trios (HRR - $\chi^2=2,454$; $df=1$; $p=0,117$; TDT - $\chi^2=2,770$; $df=1$; $p=0,096$). À semelhança da amostra total, na análise de género os resultados referentes ao polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* são negativos (sexo feminino: HRR - $\chi^2=1,953$; $df=1$; $p=0,162$; TDT - $\chi^2=3,000$; $df=1$; $p=0,083$; sexo masculino: HRR - $\chi^2=0,785$; $df=1$; $p=0,376$; TDT - $\chi^2=1,000$; $df=1$; $p=0,317$). Em relação à análise dos subtipos da PDAH, no subtipo inatento não se observou associação entre o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* e a PDAH (HRR - $\chi^2=0,000$; $df=1$; $p=1,000$; TDT - $\chi^2=0,091$; $df=1$; $p=0,763$) e no subtipo misto verificou-se uma tendência de associação entre o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* e a PDAH, utilizando as estratégias HRR e TDT (HRR - $\chi^2= 3,282$; $df=1$; $p=0,070$; TDT - $\chi^2= 3,596$; $df=1$; $p=0,058$). Na estratificação do subtipo misto, na análise de género os resultados são negativos (sexo masculino: HRR: $\chi^2=1,399$; $df=1$; $p=0,237$; TDT: $\chi^2=0,947$; $df=1$; $p=0,331$; sexo feminino: $\chi^2=1,810$; $df=1$; $p=0,178$; $\chi^2=5,44$; $df=1$; $p=0,020$), apesar da estratégia do TDT revelar um valor de $p=0,020$ para sexo feminino, mas face ao número reduzido de trios este representa um falso-positivo. Do seu conjunto, apesar de os resultados carecerem de mais estudos, parecem sugerir que o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* poderá desempenhar um papel importante no subtipo misto da PDAH.

No que se refere ao gene *p75^{NTR}* não se observou associação entre o polimorfismo S205L e a PDAH na amostra total de trios (HRR - $\chi^2=0,113$; $df=1$; $p=0,737$; TDT - $\chi^2=0,121$; $df=1$; $p=0,728$) e na estratificação por género (sexo feminino: HRR - $\chi^2=0,137$;

df=1; p=0,711; TDT $\chi^2=0,500$; df=1; p= 0,480; sexo masculino: HRR - $\chi^2=0,000$; df=1; p=1,000; TDT - $\chi^2=0,040$; df=1; p= 0,841). Relativamente aos subtipos inatento e misto também não se verificou associação entre o polimorfismo estudado e a PDAH nas estratégias utilizadas (subtipo inatento: HRR - $\chi^2=0,136$; df=1;p=0,712; TDT - $\chi^2=0,500$; df=1; p=0,480; subtipo misto: HRR - $\chi^2=0,008$; df=1; p=0,930; TDT - $\chi^2=0,000$; df=1; p=1,000). Na análise de género para o subtipo misto os resultados são negativos pelo HRR e TDT (sexo feminino: HRR - $\chi^2=0,000$; df=1; p=1,000; TDT - $\chi^2=0,200$; df=1; p=0,655; sexo masculino: HRR - $\chi^2=0,046$; df=1; p=0,830; TDT - $\chi^2=0,050$; df=1; p=0,823). No seu conjunto, os resultados parecem sugerir que o polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ não desempenha um papel direto na etiologia da PDAH.

Palavras-chave: Perturbação do défice de atenção e hiperatividade; Neurotrofinas; Genética; Estudo de Associação; genes *BDNF* e $p75^{NTR}$.

Abstract

Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) is the most common neuropsychiatric disease in children and has impacts on various social, familiar and economic levels. ADHD is characterized by symptoms of hyperactivity, impulsivity and inattention, and is subdivided into three subtypes, inattentive, hyperactive-impulsive and combined. Various evidences suggest that the neurotrophic system, particularly the *BDNF* and *p75^{NTR}* receptor, play an important role in the etiology of ADHD. In the Portuguese population there are no genetic studies related to the neurotrophic system. In this work we investigated the Val66Met polymorphisms of the *BDNF* gene and S205L of the *p75^{NTR}* gene in the etiology of ADHD and also proceeded to the gender analysis and subtypes analyses of the disease in the Portuguese population, using the PCR-RFLP method.

Through the HRR and TDT strategies it was not obtained association between Val66Met polymorphism of the *BDNF* gene and ADHD in the total sample of trios (HRR - $\chi^2=2.454$, $df=1$, $p=0.117$; TDT - $\chi^2=2.770$; $df=1$; $p=0.096$). As with the total sample, the gender analysis results for the Val66Met polymorphism of *BDNF* gene are negative (female: HRR - $\chi^2=1.953$, $df=1$, $p=0.162$; TDT - $\chi^2=3.000$; $df=1$; $p=0.083$; male: HRR - $\chi^2=0.785$, $df=1$, $p=0.376$; TDT - $\chi^2=1.000$, $df=1$, $p=0.317$). Regarding to the analysis of ADHD subtypes, in inattentive subtype there was no association between the Val66Met polymorphism of the *BDNF* gene and ADHD (HRR - $\chi^2=0.000$, $df=1$, $p=1.000$; TDT - $\chi^2=0.091$, $df=1$; $p=0.763$). Regarding the combined subtype, there was an association trend between Val66Met polymorphism of the *BDNF* gene and ADHD, using the HRR strategies and TDT (HRR - $\chi^2=3.282$, $df=1$, $p=0.070$; TDT - $\chi^2=3.596$, $df=1$, $p=0.058$). In the stratification of combined subtype, the gender analysis results are negative (male: HRR - $\chi^2=1.399$; $df=1$; $p=0.237$; TDT - $\chi^2=0.947$, $df=1$, $p=0.331$; females: HRR - $\chi^2=1.810$, $df=1$, $p=0.178$; TDT - $\chi^2=5.44$; $df=1$; $p=0.020$). Despite of the TDT strategy reveals a p value of 0.020 for females, given the reduced number of trios this p value might be a false positive. The group of results seems to suggest that Val66Met polymorphism of the *BDNF* gene may play an important role in the combined subtype of ADHD, although more studies are necessary to confirm this hint.

Regarding to the *p75^{NTR}* gene there are no association between the polymorphism S205L and ADHD in the total sample of trios (HRR - $\chi^2=0.113$; $df=1$; $p=0.737$; TDT - $\chi^2=0.121$; $df=1$; $p=0.728$) and stratification by gender (female: HRR - $\chi^2=0.137$, $df=1$, $p=0.711$; TDT - $\chi^2=0.500$, $df=1$, $p=0.480$; male: HRR - $\chi^2=0.000$, $df=1$;

p=1.000; TDT - $\chi^2=0.040$, df=1, p=0.841). In relation to inattentive and combined subtypes, there was also no association between the polymorphism studied and the strategies used in ADHD (inattentive subtype: HRR - $\chi^2=0.136$, df=1, p=0.712; TDT - $\chi^2=0.500$; df=1; p=0.480; combined subtype: HRR - $\chi^2=0.008$, df=1, p=0.930; TDT - $\chi^2=0.000$, df=1, p=1.000). Gender analysis for combined subtype results are negative by HRR and TDT (female: HRR - $\chi^2=0.000$, df=1, p=1.000; TDT - $\chi^2=0.200$, df=1, p=0.655; male: HRR - $\chi^2=0.046$, df=1, p=0.830; TDT - $\chi^2=0.050$, df=1, p=0.823). Altogether, the results seem to suggest that the S205L polymorphism of the *p75^{NTR}* gene does not play a direct role in the etiology of ADHD.

Keywords: Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD); Neurotrophins; Genetics; Association Studies; *BDNF* and *p75^{NTR}* genes.

Índice

Lista de Abreviaturas.....	3
Lista de Figuras.....	5
Lista de Tabelas.....	6
1. INTRODUÇÃO	8
1.1. Breve resenha histórica	8
1.2. Contextualização geral da PDAH.....	9
1.3. Genética da PHDA.....	10
1.4. Sistema Neurotrófico	11
1.3.1. Contextualização geral	11
1.3.2. BDNF e recetor p75 ^{NTR} : Ação e função biológica.....	13
1.3.3. Genes candidatos do sistema neurotrófico: Genes <i>BDNF</i> e <i>p75^{NTR}</i>	16
1.5. Genética e Doenças Complexas.....	17
1.5.1. Genética: conceitos gerais	17
1.5.2. Projetos e estudos genéticos	20
1.5.3. Estratégias para o mapeamento de genes	22
1.6. Objetivo	24
2. MATERIAIS E MÉTODOS	26
2.1. Seleção da amostra.....	26
2.2. Extração de DNA.....	26
2.3. Quantificação de DNA.....	28
2.4. Amplificação e digestão dos fragmentos de DNA.....	29
2.4.1. Conceitos gerais	29
2.4.1.1. <i>Polymerase Chain Reaction</i> - PCR.....	29
2.4.1.2. Enzimas de Restrição.....	31
2.4.1.3. Electroforese	31
2.4.2. Metodologia de genotipagem: Genes <i>BDNF</i> e <i>p75^{NTR}</i>	32
2.4.2.1. Polimorfismo Val66Met do gene <i>BDNF</i>	32
2.4.2.1.1. Amplificação do fragmento de DNA.....	32
2.4.2.1.2. Digestão e eletroforese em gel de agarose.....	32
2.4.2.2. Polimorfismo S205L do gene <i>p75^{NTR}</i>	33
2.4.2.2.1. Amplificação do fragmento de DNA.....	33
2.4.2.2.2. Digestão e eletroforese em gel de agarose.....	33

2.5. Análise Estatística.....	34
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
3.1. Estudo de associação entre o polimorfismo do gene <i>BDNF</i> e a PDAH	36
3.1.1. Polimorfismo Val66Met do gene <i>BDNF</i> e a PDAH.....	36
3.1.2. Amostra total de trios: Polimorfismo Val66Met do gene <i>BDNF</i> e a PDAH..	38
3.1.3. Análise de gênero: Polimorfismo Val66Met do gene <i>BDNF</i> e a PDAH.....	40
3.1.4. Análise de subtipo: Polimorfismo Val66Met do gene <i>BDNF</i> e a PDAH.....	42
3.2. Estudo de associação entre o polimorfismo do gene <i>p75^{NTR}</i> e a PDAH	45
3.2.1. Polimorfismo S205L do gene <i>p75^{NTR}</i> e a PDAH.....	45
3.2.2. Amostra total de trios: Polimorfismo S205L do gene <i>p75^{NTR}</i> e a PDAH....	46
3.2.3. Análise de gênero Polimorfismo S205L do gene <i>p75^{NTR}</i> e a PDAH.....	47
3.2.4. Análise de subtipo: Polimorfismo S205L do gene <i>p75^{NTR}</i> e a PDAH.....	49
4. CONCLUSÃO.....	53
5. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	55
6. REFERÊNCIAS	57

Lista de Abreviaturas

5-HT1Dbeta – Recetor de serotonina D beta

A – Adenina

BDNF – *Brain-derived neurotrophic factor*

C – Citosina

CPE – Carboxipeptidase E

CNVs – *Copy number variations*

DAT1 – Transportador de dopamina 1

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTPs – Desoxinucleótidos trifosfato

DRD4 – Recetor de Dopamina D4

DRD5 – Recetor de Dopamina D5

DSM-V – *Diagnostic and statistical manual of mental disorders- Fifth edition*

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

G – Guanina

GWAS – *Genome-wide association studies*

HRR – *Haplotype Relative Risk*

L – Leucina

MAPK/ERK – Map-Erk cinase

Met – Metionina

N-Glicosilação – Glicosilação do tipo N

NF-Kb – Fator nuclear kappa B

NGF – *Nerve Growth Factor*

NLB – Tampão de glóbulos brancos (*Nuclei Lysis Buffer*)

NT-3 – Neurotrofina 3

NT-4 – Neurotrofinas 4

p75^{NRT} – Recetor de neurotrofinas p75

pb – pares de base

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PDAH – Perturbação do défice de atenção e hiperatividade

PGH – Projeto genoma humano

PI3K – Fosfatidilinositol-3-cinase

PLC- γ –Fosfolipase C- γ

proBDNF – Proteína precursora imatura de BDNF

RBC – Tampão de lise dos glóbulos vermelhos (*Red Blood Cell Lysis Buffer*)

RFLPs – *Restrict fragments length polymorphisms*

S –Serina

SNAP-25 – *Synaptosomal-associated protein 25*

SNPs – *Single-nucleotide polymorphism*

STRs – *Short tandem repeats*

T –Timina

TBE –Tris borato EDTA

TDT – *Transmission disequilibrium test*

Trk – Recetores da família de tirosina cinase

TrkA – Recetores de tirosina cinase A

TrkB – Recetores de tirosina cinase B

TrkC – Recetores de tirosina cinase C

Val – Valina

VNTRs – *Variable number of tandem repeats*

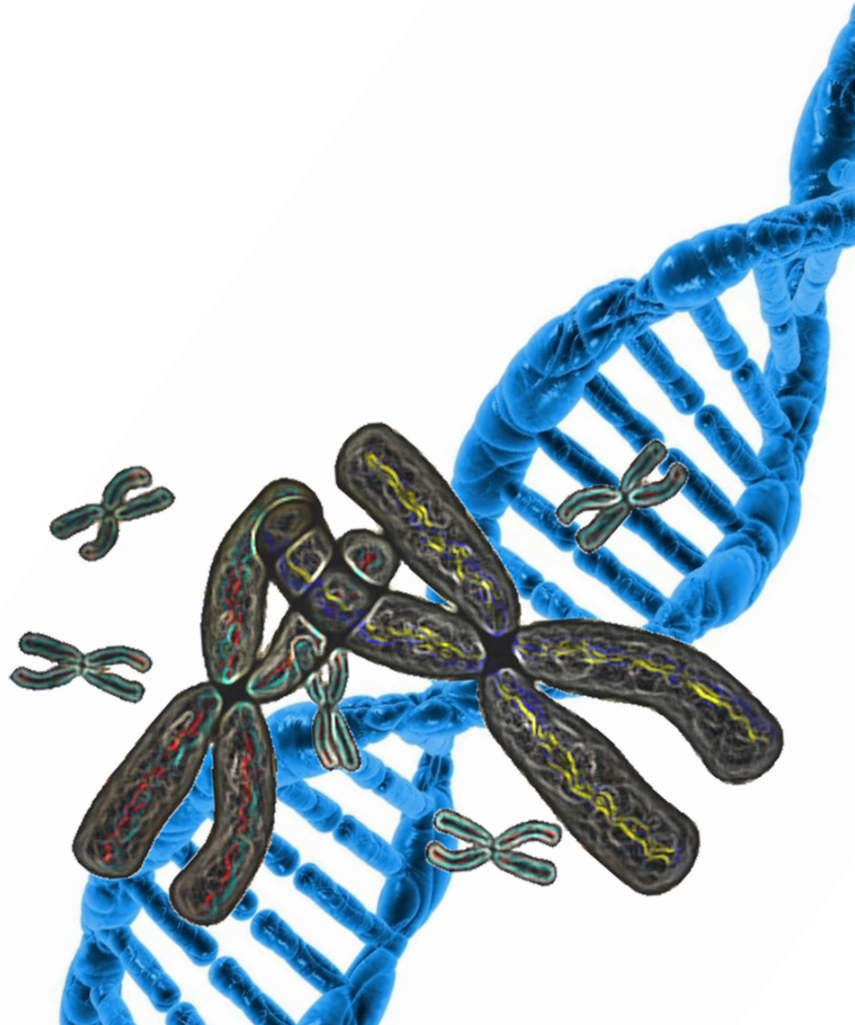
Lista de Figuras

Figura 1: Neurotrofinas e seus recetores: interações dos quatro tipos de neurotrofinas presentes nos mamíferos.....	12
Figura 2: Vias de sinalização decorrentes da interação entre as neurotrofinas e os seus recetores Trk e p75 ^{NTR}	15
Figura 3: Dupla hélice do DNA e processo de formação dos cromossomas.....	18
Figura 4: Os cinco tipos de polimorfismos existentes no genoma humano: RFLP, VNTR, STR, SNP e CNV.....	20
Figura 5: Estratégias de estudos de associação: casos-controlo (A) e com base em famílias (B).....	22
Figura 6: Representação esquemática do método enzimático de extração de DNA.....	27
Figura 7: Espectrofotómetro Bio-Rad SmartSpec Plus utilizado na quantificação do DNA.....	28
Figura 8: Técnica de PCR: desnaturação do DNA, ligação dos <i>primers</i> (<i>annealing</i>) e a extensão da nova cadeia de DNA.....	30
Figura 9: Local de clivagem da enzima de restrição Eco72I.....	32
Figura 10: Local de clivagem da enzima de restrição BanII.....	34
Figura 11: Esquema e localização do polimorfismo Val66Met do gene <i>BDNF</i>	36
Figura 12: Eletroforese em gel de agarose 2% para testar a amplificação do fragmento de 113 pb relativo ao polimorfismo Val66Met do gene <i>BDNF</i>	37
Figura 13: Perfil eletroforético do polimorfismo Val66Met do gene <i>BDNF</i> , em gel de agarose a 3,5%, após digestão com a enzima de restrição Eco72I.....	37
Figura 14: Esquema da estrutura do gene <i>p75^{NTR}</i>	45
Figura 15: Eletroforese em gel de agarose a 2% para testar a amplificação do fragmento de 386 pb do gene <i>p75^{NTR}</i>	45
Figura 16: Perfil eletroforético do polimorfismo S205L do gene <i>p75^{NTR}</i> em gel de agarose a 3%.....	46
Figura 17: Vias de sinalização decorrentes da interação do BDNF com o recetor TrkB.....	55

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Polimorfismo Val66Met do gene <i>BDNF</i> na amostra total de trios: estratégias HRR e TDT.....	38
Tabela 2: Polimorfismo Val66Met do gene <i>BDNF</i> na amostra de trios relativa ao sexo feminino: estratégias HRR e TDT.....	40
Tabela 3: Polimorfismo Val66Met do gene <i>BDNF</i> na amostra de trios relativa ao sexo masculino: estratégias HRR e TDT.....	41
Tabela 4: Polimorfismo Val66Met do gene <i>BDNF</i> na amostra de trios relativa ao subtipo inatento: estratégias HRR e TDT.....	42
Tabela 5: Polimorfismo Val66Met do gene <i>BDNF</i> na amostra de trios relativa ao subtipo misto: estratégias HRR e TDT.....	43
Tabela 6: Polimorfismo Val66Met do gene <i>BDNF</i> na amostra de trios relativa ao sexo masculino do subtipo misto: estratégias HRR e TDT.....	44
Tabela 7: Polimorfismo Val66Met do gene <i>BDNF</i> na amostra de trios relativa ao sexo feminino do subtipo misto: estratégias HRR e TDT.....	44
Tabela 8: Polimorfismo S205L do gene <i>p75^{NTR}</i> na amostra de trios total: estratégias HRR e TDT.....	46
Tabela 9: Polimorfismo S205L do gene <i>p75^{NTR}</i> na amostra relativa ao sexo feminino: estratégias HRR e TDT.....	48
Tabela 10: Polimorfismo S205L do gene <i>p75^{NTR}</i> na amostra relativa ao sexo masculino: estratégias HRR e TDT.....	48
Tabela 11: Polimorfismo S205L do gene <i>p75^{NTR}</i> na amostra relativa ao subtipo inatento: estratégias HRR e TDT.....	49
Tabela 12: Polimorfismo S205L do gene <i>p75^{NTR}</i> na amostra relativa ao subtipo misto: estratégias HRR e TDT.....	50
Tabela 13: Polimorfismo S205L do gene <i>p75^{NTR}</i> na amostra relativa ao sexo feminino do subtipo misto: estratégias HRR e TDT.....	50
Tabela 14: Polimorfismo S205L do gene <i>p75^{NTR}</i> na amostra relativa ao sexo masculino do subtipo misto: estratégias HRR e TDT.....	51

Introdução



1. Introdução

1.1. Breve resenha histórica

A designação da Perturbação do Défice de Atenção e Hiperatividade (PDAH) é relativamente recente. No entanto, existe literatura histórica que revela que esta patologia foi sendo descrita por diversos autores ao longo dos últimos três séculos (Lange et al., 2010; Barkley e Peters, 2012). De facto, a caracterização da PDAH apresenta discordância na literatura, uma vez que Melchior Adam Weikard e Alexander Crichton descreveram, de forma individual, no final do século XVIII, uma patologia que se assemelha à atual PDAH na qual os doentes manifestam sintomas de inatenção (Lange et al., 2010; Barkley e Peters, 2012). Posteriormente, Heinrich Hoffmann escreveu um livro de histórias infantis no qual incluiu a história *Fidgety Phil* que retratava uma criança com comportamentos característicos da PDAH (Lange et al., 2010). No início do século XX surgiu a primeira descrição científica da doença por George Frederic Still (Still, 1902) que mais se assemelha à atual caracterização da PDAH (Lange et al., 2010). Embora a caracterização da patologia descrita por Still apresente diferenças relativamente à PDAH, alguns dos sintomas nos seus doentes serviram de base, anos mais tarde, como critérios de classificação para o diagnóstico da PDAH (Lange et al., 2010). Após a caracterização de Still, houve evolução na descrição da patologia, principalmente com ênfase nas características de hiperatividade nos indivíduos. Assim, em 1968 o conceito de hiperatividade foi englobado, pela primeira vez, na segunda edição do *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-II), publicado pela Associação Americana de Psiquiatria (Lange et al., 2010). A definição e os critérios de diagnóstico da patologia foram sendo alterados ao longo das três edições posteriores na DSM-III, DSM-IV e mais recentemente DSM-V. É importante ainda referir que existe uma forma alternativa de classificação da PDAH, utilizando a Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde da Organização Mundial de Saúde.

Atualmente, o diagnóstico da PDAH é essencialmente clínico e é difícil, devido às várias comorbilidades associadas e à elevada heterogeneidade clínica. Este facto tem potenciado o interesse pelos estudos a nível molecular que poderão comprovar o diagnóstico clínico e, conseqüentemente conduzir a terapias individualizadas dos doentes com PDAH.

1.2. Caracterização geral da PDAH

A PDAH é a doença neuropsiquiátrica mais comum na infância e adolescência e caracteriza-se por sintomas de hiperatividade, impulsividade e falta de atenção. A nível mundial, a PDAH afeta cerca de 8% a 12% de crianças (Faraone et al., 2005; Hawi et al., 2015), sendo mais prevalente em indivíduos do sexo masculino comparativamente ao feminino (3:1) (Swanson et al., 1998). Existem três subtipos, nomeadamente o inatento, hiperativo/impulsivo e misto, e com o avanço da idade verifica-se que a prevalência desta patologia tende a diminuir para valores entre 2,5% a 3,4% (Fayyad et al., 2007; Simon et al., 2009). As crianças com PDAH apresentam normalmente baixo rendimento escolar e mau comportamento na escola e em casa. No adulto, a patologia está associada a um comportamento antissocial e criminoso, dificuldade em criar amizades, risco acrescido de dependência de drogas, baixo rendimento no emprego e, conseqüentemente, taxas de desemprego elevadas (Faraone et al., 2003; Thapar et al., 2012, Hawi et al., 2015).

Com base nos estudos familiares, de gémeos e de adoção a componente genética da PDAH foi estimada entre 60% a 90% (Mick et al., 2008). De facto, a PDAH é uma patologia multifatorial resultante de vários fatores genéticos e ambientais (Thapar et al., 2012). Contudo, a existência de um fator de risco não é necessário nem suficiente para a expressão da patologia (Thapar et al., 2012). Embora os fatores genéticos sejam cruciais para a expressão desta doença, existem também vários fatores ambientais associados à mesma, subdividindo-se em três grupos: pré-natal, peri-natal e pós-natal (Millichap 2008; Thapar et al., 2012). Relativamente ao grupo pré-natal associam-se todos os hábitos e dependências que a gestante pode apresentar durante a fase de gestação, como por exemplo o abuso de drogas ilícitas ou lícitas. De acordo com diversos estudos desenvolvidos para avaliar os efeitos do tabaco na fase de gestação, verificou-se que o consumo desta droga, na fase pré-natal, está associada ao desenvolvimento de PDAH na criança (Milberger et al., 1996; Milberger et al., 1998; Han et al., 2015). Relativamente ao abuso de álcool, e uma vez que esta substância pode induzir anomalias na estrutura cerebral e levar ao desenvolvimento de problemas comportamentais e cognitivos (Lebel et al., 2011), Han e colaboradores efetuaram estudos nos quais se observou que o consumo de álcool na fase de gestação é um fator de risco para o desenvolvimento de PDAH (Han et al., 2015). Para além disso, verificou-se ainda que crianças expostas ao álcool durante a fase pré-natal têm maior probabilidade de apresentar hiperatividade, um comportamento impulsivo, um risco acrescido para doenças psiquiátricas e problemas sociais (Huizink et

al., 2006). De facto, o consumo de álcool e tabaco na fase de gestação provoca danos a nível cerebral e alterações a nível comportamental associados à PDAH (Banerjee et al., 2007; Millichap 2008; Amiri et al., 2012; Thapar et al., 2012). No grupo peri-natal, a prematuridade e o baixo peso do bebé à nascença são fatores de risco para a PDAH, particularmente para o desenvolvimento do subtipo inatento (Bhutta et al., 2002; Aarnoudse-Moens et al., 2009). Os fatores pós-natal incluem traumas cerebrais, meningites, alterações metabólicas ou hormonais e deficiências nutricionais (Millichap 2008). Tendo em conta os fatores ambientais, estes podem funcionar como um “gatilho” na expressão da doença se o indivíduo tiver o fator de risco genético (Millichap 2008).

Estudos de neuroimagem revelaram alterações na estrutura de várias regiões cerebrais em indivíduos com PDAH, tais como redução no volume das regiões do córtex pré-frontal, cerebelo e putamen caudado (Curatolo et al., 2010; Baroni e Castellanos, 2015).

1.3. Estudos genéticos da PDAH

A PDAH é a patologia neuropsiquiátrica mais estudada na infância em todo o mundo, contudo, a identificação de genes e de mecanismos etiológicos permanecem por esclarecer. Estudos com modelos animais, clínicos, farmacológicos e de neuroimagem têm implicado vários sistemas de neurotransmissores na etiologia da PDAH. Dos vários sistemas de neurotransmissores, genes dos sistemas dopaminérgico, serotoninérgico e noradrenérgico têm sido os mais estudados e replicados por meta-análises em diferentes populações mundiais (Li et al., 2014a; Hawi et al., 2015). Particularmente até ao momento, estão associados à PDAH o gene que codifica o recetor de dopamina D4 (DRD4), o gene que codifica o recetor de dopamina D5 (DRD5), o gene que codifica o transportador de Dopamina (DAT1), o gene que codifica o recetor de serotonina 5HT1Dbeta e o gene que codifica a Synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25), proteína envolvida no encerramento em vesículas e na libertação de neurotransmissores para a fenda sináptica (Sharp et al., 2009; Banaschewski et al., 2010; Poelmans et al., 2011; Li et al., 2014a; Hawi et al., 2015). Na população portuguesa efetuaram-se também estudos com os genes DRD4, DAT, 5-HT1Dbeta e SNAP-25 e dos vários genes estudados, todos os resultados são negativos à exceção do gene SNAP-25. A nível mundial também têm sido realizados vários estudos do *genome-wide linkage scan* e *genome-wide association study* (GWAS) e os resultados não são conclusivos (Zhou et al.,

2008; Franke et al., 2009; Sharp et al., 2009; Poelmans et al., 2011; Li et al., 2014a). Contudo, evidências nominais ou sugestivas de *linkage* de várias regiões genômicas sugerem locais de novos genes de suscetibilidade para a PHDA. Face ao exposto é crucial o estudo de novos genes em amostras de outras populações mundiais no sentido de se identificarem os genes de suscetibilidade para a PDAH e desta forma contribuir para um diagnóstico mais correto e terapêuticas individualizadas.

1.4. Sistema Neurotrófico

1.4.1. Contextualização geral

As neurotrofinas são uma família de proteínas altamente conservadas que regulam importantes funções neuronais, como a plasticidade, o desenvolvimento, a sobrevivência e a função neuronal (Reichardt, 2006). Normalmente as neurotrofinas encontram-se em monômeros ou homodímeros, mas, no entanto, algumas destas proteínas podem existir também sob a forma de estruturas heterodiméricas, apesar de não existirem evidências que essas mesmas estruturas existam em concentrações significativas *in vivo* (Huang e Reichardt, 2001; Reichardt, 2006). Nos mamíferos estão caracterizadas quatro neurotrofinas diferentes – *Nerve Growth Factor* (NGF), *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), Neurotrofina-3 (NT-3) e Neurotrofina-4 (NT-4) - que interagem com dois tipos de recetores – os recetores da família da Tirosina Cinase (*Tropomyosin related cinase* - Trk) e o recetor de neurotrofinas p75 (p75^{NTR}) (Huang e Reichardt, 2001; Teng e Hempstead, 2004; Reichardt, 2006). Relativamente aos recetores da família tirosina cinase, existem três diferentes membros destes recetores nos mamíferos, nomeadamente TrkA, TrkB e TrkC (Figura 1). Para ambos os recetores Trk o domínio extracelular apresenta a seguinte ordem de constituição: um *cluster* rico em cisteínas, três repetições ricas em leucinas, novo *cluster* rico em cisteínas e, por fim, dois domínios do tipo imunoglobulina. Estes recetores atravessam a membrana uma única vez e apresentam no domínio citoplasmático terminal um domínio de tirosinas cinases que serve como local de interação para enzimas ou proteínas adaptadoras citoplasmáticas (Chao, 2003; Reichardt, 2006). As neurotrofinas interagem preferencialmente com estes recetores através dos seus domínios do tipo imunoglobulina da membrana proximal, e a dimerização dos recetores Trk com estas proteínas, resulta na ativação por transfosforilação das cinases existentes no domínio citoplasmático, promovendo a diferenciação e sobrevivências das células neuronais (Chao et al., 2006; Reichardt, 2006).

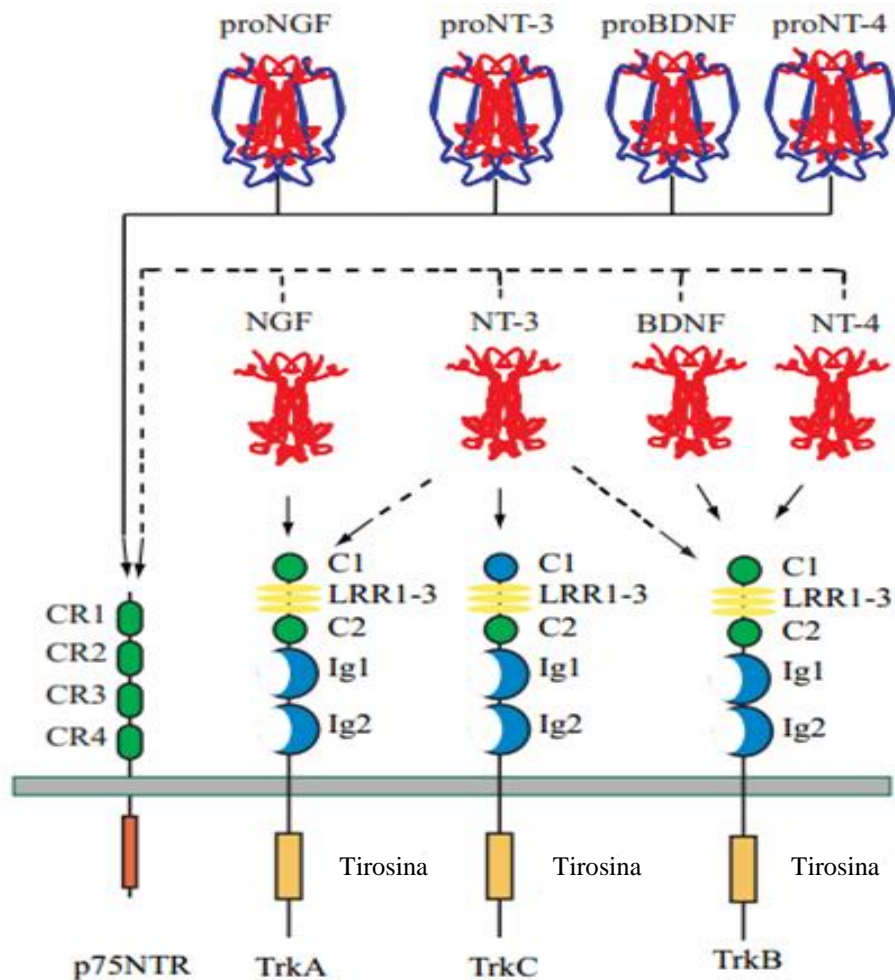


Figura 1: Neurotrofinas e seus recetores: interações dos quatro tipos de neurotrofinas presentes nos mamíferos. Todas as proneurotrofinas ligam-se com alta afinidade ao recetor p75^{NTR}, enquanto as neurotrofinas maduras ligam-se com menor afinidade a este mesmo recetor. Relativamente aos recetores da família Tirosina Cinase apenas se ligam neurotrofinas maduras. Cada uma destas neurotrofinas apresenta uma maior afinidade para um desses recetores: NGF liga-se especificamente ao recetor TrkA; BDNF e NT-4 ligam-se de forma específica ao TrkB; NT-3 liga-se com grande afinidade ao recetor TrkC e com menor afinidade aos recetores TrkA e TrkB. (Figura adaptada de Reichardt, 2006).

As quatro neurotrofinas apresentam diferentes especificidades na interação com os três membros desta família de recetores, uma vez que o NGF ativa especificamente o TrkA, o BDNF e NT-4 ativam de forma específica o TrkB e o NT-3 ativa ambos os recetores Trk, no entanto interagindo apenas com grande especificidade com o TrkC (Huang e Reichardt, 2001; Teng e Hempstead, 2004; Reichardt 2006).

O recetor p75^{NTR} pertence à superfamília dos recetores de fatores de necrose tumoral e, inicialmente pensava-se que apenas apresentava uma baixa afinidade para o NGF, mas, atualmente sabe-se que este recetor possui uma afinidade idêntica para todas as neurotrofinas (Huang e Reichardt, 2001; Reichardt, 2006; Almeida e Duarte, 2014)). Na sua estrutura, o recetor p75^{NTR} apresenta um domínio extracelular com quatro regiões ricas em cisteínas, um domínio transmembranar e um domínio citoplasmático idêntico aos que existem nos restantes recetores da sua família (Reichardt, 2006; Almeida e Duarte, 2014). Este recetor não apresenta na sua constituição um domínio catalítico, no entanto ele interage com diversas proteínas transmitindo sinais importantes para a regulação da sobrevivência de células neuronais (Huang e Reichardt, 2001; Reichardt, 2006). As neurotrofinas e as proneurotrofinas podem ativar o recetor p75^{NTR}, de onde resultam diferentes vias de sinalização com funções biológicas opostas – sobrevivência e apoptose neuronal (Huang e Reichardt, 2001; Reichardt, 2006).

Os genes que codificam as neurotrofinas apresentam algumas semelhanças como, por exemplo, a existência de múltiplos promotores. Para além disso, após a expressão das neurotrofinas, estas apresentam também na sua estrutura alguns elementos comuns, tais como uma sequência sinal e um pró-domínio seguido da sequência que codifica a proteína madura (Reichardt, 2006). Desta forma, as neurotrofinas são expressas na forma de proneurotrofinas e, posteriormente, por clivagem proteolítica formam-se as neurotrofinas maduras. Devido às semelhanças referidas na estrutura e ação destas proteínas, alguns investigadores defendem que provêm de um gene ancestral comum (Huang e Reichardt, 2001; Reichardt, 2006).

1.4.2. BDNF e recetor p75^{NTR}: Ação e função biológica.

A molécula de BDNF é a neurotrofina mais abundante e bem distribuída do sistema nervoso central dos mamíferos, sendo particularmente expressa na região do hipocampo e córtex cerebral (Binder e Scharfman, 2004; Liu et al., 2014). Barde e colaboradores (1982) purificaram o BDNF pela primeira vez e verificaram que este promove a sobrevivência de células neuronais. A partir desta descoberta, vários trabalhos de investigação foram desenvolvidos de modo a avaliar a ação biológica e fisiológica do BDNF, desde o seu papel no desenvolvimento cerebral até à sua ação na fisiologia de diversas doenças do foro psiquiátrico, nomeadamente na PDAH. No sistema biológico existem duas isoformas diferentes de BDNF, o proBDNF – proteína precursora imatura

de BDNF – e a proteína madura de BDNF que apresentam entre si diferentes atividades biológicas e afinidades na interação com os recetores de neurotrofinas referidos anteriormente (Huang e Reichardt, 2001; Reichardt 2006; Autry e Monteggia, 2012).

A molécula de proBDNF possui cerca de 30-35 kDa e apresenta na sua estrutura um codão de iniciação, uma sequência sinal e um pró-domínio que contém uma região de glicosilação do tipo N (N-glicosilação) (Binder e Scharfman, 2004). Esta molécula é sintetizada no retículo endoplasmático e armazenada no complexo de Golgi. No retículo endoplasmático, o pro-BDNF pode ainda sofrer clivagem por furinas ou por enzimas pró-convertases, originando a proteína madura BDNF (Teng et al., 2010). No entanto, a clivagem das neurotrofinas pode também ocorrer fora das células pela plasmina ou pelas metaloproteases. No complexo de Golgi ocorre a ligação do pró-domínio da neurotrofina com uma proteína sortilina que permite o correto enrolamento da molécula de BDNF e a sua ligação com a carboxipeptidase E (CPE) (Lu et al., 2005). A CPE encaminha o BDNF para a via regulada por Ca^{2+} , sendo este ião regulador da libertação da neurotrofina das vesículas onde se encontra armazenada (Lu et al., 2005).

O BDNF liga especificamente e com grande afinidade ao recetor TrkB desencadeando uma longa cascata de sinalização de onde resulta a ativação de três vias biológicas diferentes: a via da Fosfolipase C- γ (PLC- γ), a via fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) e a via Map-Erk cinase (MAPK/ERK) (Patapoutian e Reichardt, 2001). A ativação das vias PI3K e MAPK/ERK promovem a sobrevivência e diferenciação neuronal, enquanto a via PLC- γ promove a transcrição e a plasticidade sináptica (Huang e Reichardt, 2001; Reichardt 2006).

O recetor p75^{NTR} é altamente expresso em diversas regiões do sistema nervoso durante a sua fase inicial de desenvolvimento (Bartkowska et al., 2010), nomeadamente nos neurónios motores da medula espinal e do tronco cerebral, cerebelo, hipocampo, córtex cerebral, prosencéfalo basal e putamen caudado (Almeida e Duarte, 2014). No estado adulto, a expressão deste recetor cessa na maior parte das regiões referidas, continuando a ser expresso no prosencéfalo basal, cerebelo e putamen caudado (Almeida e Duarte, 2014).

Relativamente à ligação do proBDNF e do BDNF ao recetor p75^{NTR}, ambas as moléculas estabelecem ligação com este recetor, no entanto, ativam diferentes vias internas de transdução do sinal, como a Jun cinase, o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e a via das Rho (Figura 2).

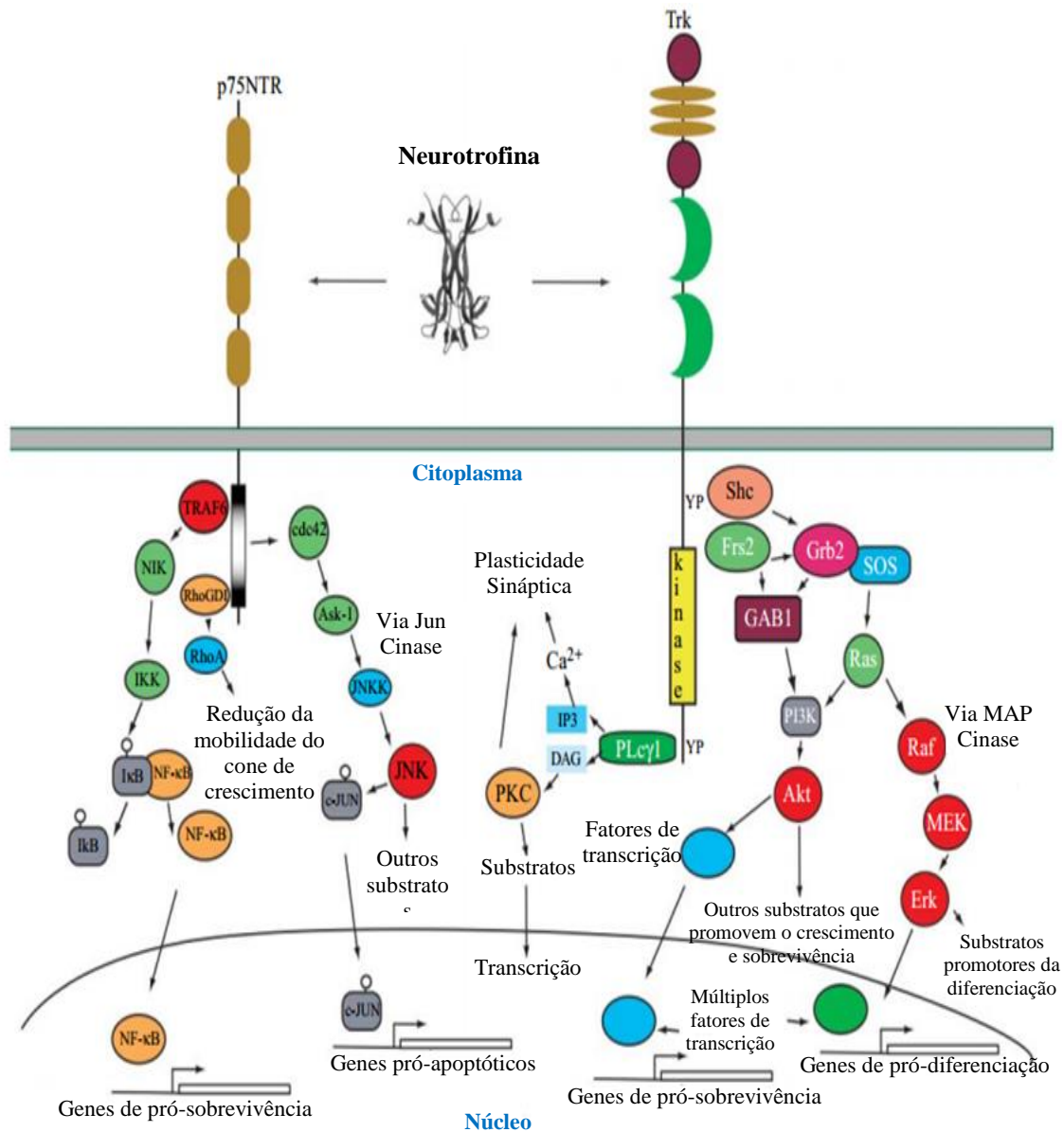


Figura 2: Vias de sinalização decorrentes da interação entre as neurotrofinas e os seus recetores Trk e p75^{NTR}. Os recetores Trk vão regular três vias de sinalização distintas promovendo a plasticidade sináptica, a diferenciação neuronal e a sobrevivência neuronal. Relativamente ao recetor p75^{NTR} também resulta a ativação de três vias de sinalização diferentes, no entanto com papéis biológicos diferentes, podendo ser promovida a sobrevivência ou a apoptose neuronal (Figura adaptada de Reichardt, 2006).

A ligação do proBDNF com o p75^{NTR} resulta na formação de um complexo entre a neurotrofina, o recetor e proteínas sortilinas, sendo estas proteínas necessárias para que se desencadeie a apoptose neuronal, através da via Jun cinase (Kaplan et al., 2000; Reichardt 2006; Fujii e Kunugi., 2009). Por outro lado, a ligação do BDNF ao recetor p75^{NTR} permite a interação com o recetor TrkB, ativando a via NF-κB, que por sua vez

induz a expressão de genes que estão envolvidos na sobrevivência neuronal (Kaplan et al., 2000; Reichardt 2006; Fujii e Kunugi, 2009).

1.4.3. Genes candidatos do sistema neurotrófico: Genes *BDNF* e *p75^{NTR}*

Diversas evidências sugerem que o sistema neurotrófico apresenta um papel importante na etiologia da PDAH, particularmente os genes *BDNF* e *p75^{NTR}*. Estudos *in vitro* demonstraram que o BDNF apresenta um papel importante na diferenciação e sobrevivência de neurónios dopaminérgicos do mesencéfalo (Hyman et al., 1991; Knüsel et al., 1991; Spina et al., 1992). Assim, como o BDNF modula a atividade dos neurónios dopaminérgicos no mesencéfalo, alterações genéticas que ocorram nesta neurotrofina podem resultar numa disfunção ao nível do sistema dopaminérgico desta região cerebral (Solanto 2002; Tsai 2007). Por exemplo, estudos com modelos animais revelaram que o BDNF é modelador da libertação de dopamina através da ativação do TrkB (Blochl e Sirrenberg, 1996). Estudos com animais revelaram ainda que há aumento dos níveis de BDNF após a administração de amfetamina (Meredith et al., 2002), sendo esta substância utilizada no tratamento para a PDAH e moduladora dos sistemas de neurotransmissão referidos anteriormente. Particularmente importante, Shim e colaboradores (2008) efetuaram um estudo em crianças com PDAH e observaram no plasma um aumento dos níveis de BDNF que foi correlacionado com a presença de sintomas de inatenção nas crianças (Shim et al., 2008). Para além disso, verificou-se também um aumento dos níveis de BDNF após a administração de metilfenidato a crianças com a patologia (Amiri et al., 2013). Este composto é utilizado frequentemente no tratamento da PDAH e sabe-se que atua como modelador da libertação de dopamina e noradrenalina. Face ao exposto, alterações que ocorram no gene *BDNF* poderão levar a alterações na função biológica desta neurotrofina, podendo estar associadas à PDAH.

O gene *BDNF* está localizado no cromossoma 11, mais concretamente na região 11p13, possuindo nove promotores funcionais e um tamanho de aproximadamente 28 kDa (Binder e Scharfman, 2004; Pruunsild et al., 2007). Foram identificados vários polimorfismos no gene *BDNF*, bem como o *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) Val66Met (rs6265) que consiste numa substituição de um nucleótido de Guanina por uma Adenina na posição 196 que se localiza no pró-domínio da molécula de BDNF (Dincheva et al., 2012). Face às evidências referidas anteriormente e ao facto do polimorfismo

Val66Met ter sido associado a uma alteração no armazenamento, libertação e distribuição da molécula de BDNF *in vitro* (Egan et al., 2003), o gene BDNF é altamente promissor para a etiologia da PDAH. No entanto, até ao momento não existem estudos na população portuguesa para o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* na PDAH e existem várias inconsistências na literatura publicada de estudos genéticos efetuados noutras populações mundiais (Kent et al., 2005; Xu et al., 2006; Lee et al., 2007; Tzang et al., 2013). Assim, estudos adicionais são importantes para se esclarecer uma eventual associação do gene *BDNF* e a PDAH.

Relativamente ao recetor $p75^{NTR}$, este poderá desempenhar um papel importante na etiologia da PDAH. O recetor $p75^{NTR}$ é expresso no cerebelo, córtex cerebral e putamen caudado (Almeida e Duarte, 2014), regiões cerebrais que estão associadas à PDAH (Curatolo et al., 2010; Baroni e Castellanos, 2015). Para além disso, o recetor $p75^{NTR}$ é local de ligação de diferentes neurotrofinas referidas anteriormente, nomeadamente ao BDNF. O gene $p75^{NTR}$ está localizado na região cromossómica 17q21-22 (Huebner et al., 1986) e possui seis exões e cinco intrões (Sehgal et al., 1988).

De acordo com as evidências referidas anteriormente, os genes *BDNF* e $p75^{NTR}$ são promissores para a etiologia da PDAH. No entanto, até ao momento os estudos efetuados são inconsistentes para o gene *BDNF* ou inexistentes para o gene $p75^{NTR}$, excetuando um estudo caso-controlo efetuado por Conner e colaboradores (2008), havendo pois muita carência de estudos adicionais em diferentes populações mundiais, particularmente na população portuguesa.

1.5. Genética e Doenças Complexas

1.5.1. Genética: conceitos gerais

A informação genética dos seres vivos encontra-se armazenada na molécula orgânica designada como Ácido Desoxirribonucleico (DNA, da expressão inglesa *Deoxyribonucleic Acid*), cuja estrutura foi descoberta, em 1953, pelos investigadores James Watson e Francis Crick (Watson e Crick, 1953). Esta molécula contém a informação necessária para a produção de proteínas e de ácidos ribonucleicos (RNA – da expressão inglesa *Ribonucleic Acid*), essenciais para o correto funcionamento e desenvolvimento de todos os seres vivos. Cada unidade estrutural do DNA (nucleótido) apresenta na sua constituição uma molécula de açúcar com cinco carbonos (desoxirribose), um grupo fosfato e uma base azotada, a Guanina (G), a Citosina (C), a

Timina (T) e Adenina (A) (Strachan e Read, 2011). As bases azotadas consistem em anéis heterocíclicos de átomos de carbono e azoto e encontram-se divididas em dois grupos: Pirimidinas (Timina e Citosina) que possuem apenas um anel aromático, e Purinas (Adenina e a Guanina) que possuem dois anéis aromáticos interligados (Strachan e Read, 2011). Cada cadeia de DNA resulta da ligação de nucleótidos através de ligações covalentes fosfodiésteres onde o grupo fosfato estabelece a ligação do carbono 3' de um açúcar com o carbono 5' do açúcar seguinte (Strachan e Read, 2011). O DNA possui uma estrutura em dupla hélice, onde as duas cadeias nucleotídicas se encontram ligadas por ligações de hidrogénio estabelecidas entre bases complementares, de acordo com as regras de complementaridade definidas por Watson-Crick (Watson e Crick, 1953). De acordo com os investigadores Watson e Crick, esta molécula apresenta uma estrutura antiparalela, uma vez que as duas cadeias apresentam uma orientação oposta que se deve às ligações fosfodiéster que são estabelecidas pelos nucleótidos das cadeias de DNA, existindo uma cadeia com o sentido o 5'→3' e a outra com o sentido 3'→5' (Strachan e Read, 2011).

Nas células humanas, o DNA encontra-se principalmente localizado no núcleo celular, embora existam pequenas quantidades desta macromolécula nas mitocôndrias. O processo de armazenamento do material genético no núcleo deve-se ao seu superenrolamento através da ação das proteínas Histonas (Figura 3).

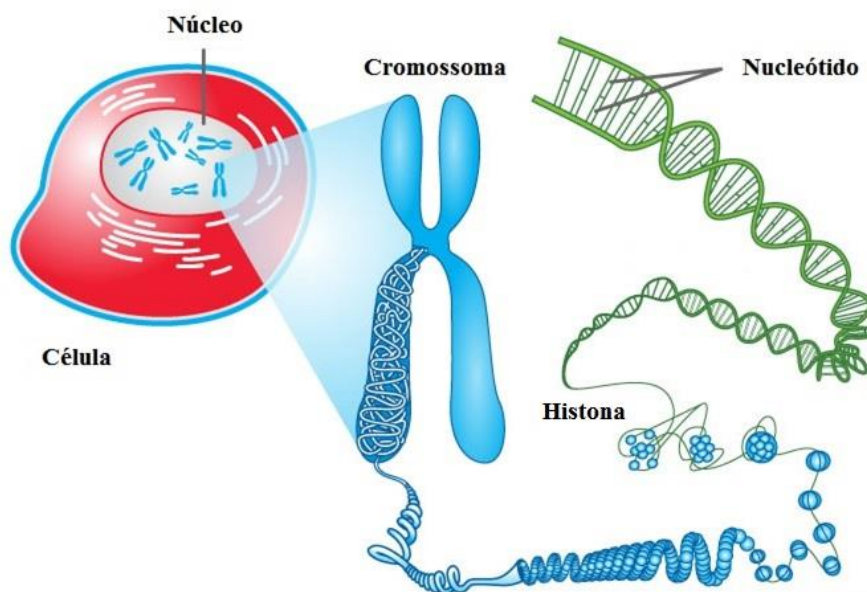


Figura 3: Dupla hélice do DNA e processo de formação dos cromossomas (adaptado de imagem da Universidade de Waikato).

A pH neutro, estas proteínas apresentam carga positiva que neutraliza a carga superficial negativa do DNA proveniente dos seus grupos fosfatos. Assim, o enrolamento do DNA leva à formação dos cromossomas, que desta forma, permitem à célula confinar e armazenar toda a informação genética essencial à sua sobrevivência.

O genoma humano é constituído por todo o material genético existente na célula humana diplóide, consistindo em 23 pares de cromossomas que se subdividem em 22 pares autossómicos e um sexual. O genoma contém os genes que possuem na sua estrutura exões (zonas codificantes de aminoácidos), intrões (zonas não codificantes de aminoácidos) e regiões reguladoras 5'UTR e 3'UTR. A região do genoma onde está localizado o gene, designa-se *locus* (plural: *loci*), podendo o gene apresentar diferentes formas alternativas (alelos) (Burmeister, 1999). Por definição clássica, polimorfismo consiste na existência de pelo menos dois alelos para um *locus* numa população, se o alelo raro ocorrer numa percentagem superior a 1%. (Burmeister, 1999; Frazer et al., 2009). Os polimorfismos existem abundantemente no genoma humano, pelo que são utilizados em larga escala nos estudos genéticos. Atualmente sabe-se que existem diversos tipos de polimorfismos, *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (RFLPs), microssatélites ou *Short Tandem Repeats* (STRs), minissatélites ou *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTRs), *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) e *Copy-Number Variations* (CNVs). Os RFLPs foram os primeiros polimorfismos a serem descobertos e consistem na substituição de um par de bases no local de clivagem reconhecido por uma determinada enzima de restrição (Nakamura, 2009). Normalmente apresentam dois alelos onde apenas um possui local de clivagem para a enzima. Assim, após a digestão enzimática, os fragmentos resultantes vão apresentar diferentes padrões de restrição. Por outro lado, os STRs e VNTRs consistem em várias repetições de unidades de DNA com 2-6 pares de bases (pb) e 9-100 pb, respetivamente (Figura 4). Deste modo, os alelos destes polimorfismos são facilmente distinguidos pelos diferentes números de repetições que possuem refletindo diferenças nos pesos moleculares dos fragmentos de DNA resultantes (Nakamura, 2009). Os SNPs consistem em variações num único nucleótido e são amplamente utilizados nos estudos genéticos devido à sua elevada abundância no genoma humano (1-300 ou 400pb) e ao facto da metodologia utilizada se encontrar altamente automatizada. Por fim, os CNVs são variações de números de cópias de segmentos do genoma que incluem deleções, duplicações, inserções e inversões de uma região do genoma (Nakamura, 2009). Assim sendo, os CNVs permitem diferenças de várias mega bases (Mb) entre genomas humanos contribuindo para a diversidade genética.

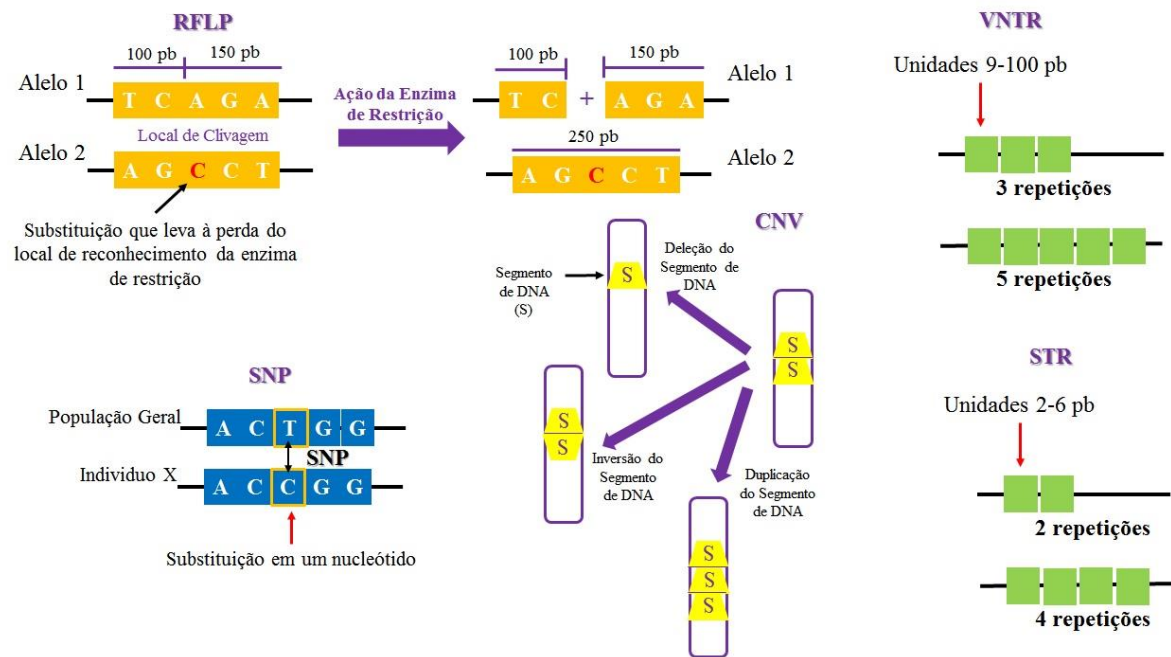


Figura 4: Os cinco tipos de polimorfismos existentes no genoma humano: RFLP, VNTR, STR, SNP e CNV.

1.5.2. Projetos e estudos genéticos

Na década de oitenta do século passado, diversos investigadores de vários países a nível mundial, nomeadamente EUA, Reino Unido, Japão, França, Alemanha e China, iniciaram a implementação do Projeto Genoma Humano (PGH) que revolucionou a área da medicina, particularmente a genética médica. O PGH tinha como objetivo principal mapear e sequenciar todo o genoma humano (Sawicki et al., 1993; *The International Human Genome Sequencing Consortium*, 2001). Em 2003, o PGH foi finalizado e mais de 95% do genoma foi sequenciado (*The International Human Genome Sequencing Consortium*, 2004) e descobriu-se que este continha menos de 30 mil genes que codificam proteínas (Collins et al., 2003; *The International Human Genome Sequencing Consortium*, 2004). Desta forma, os investigadores concluíram que um gene codifica para uma média de três proteínas diferentes e que apenas 2% do genoma humano é utilizado na produção de proteínas. Verificou-se também que entre indivíduos 99,9% do seu genoma é semelhante, variando apenas 0,1% de indivíduo para indivíduo.

Todas estas descobertas foram cruciais e potenciaram o desenvolvimento de um segundo projeto designado de *HapMap* (*The International HapMap Project*, 2003). Com

este projeto os investigadores de diversos países mundiais, nomeadamente Canadá, China, Japão, Reino Unido e EUA, pretendiam continuar e complementar o PGH. Assim, o projeto *HapMap* focou-se no estudo dos 0,1% do genoma humano e para o seu desenvolvimento utilizaram-se indivíduos da população europeia, asiática e africana. Assim, através do projeto *HapMap* foram obtidos mapas de haplótipos baseados em tagSNPs (*The International HapMap Consortium, 2007*). Numa terceira fase do *HapMap*, integrou-se CNVs, SNPs de baixa frequência e SNPs comuns em uma amostra populacional mais diversificada para se estudar a variação genética entre populações humanas (*The International HapMap 3 Consortium, 2010*).

O projeto *HapMap* abriu caminho para o desenvolvimento de um terceiro projeto em 2008 designado por 1000 Genomas que envolveu um consórcio com investigadores dos EUA, Reino Unido e China. O projeto 1000 Genomas pretendia descobrir, genotipar e revelar informações precisas de todas as variantes genéticas existentes no genoma humano, em várias populações mundiais (*The 1000 Genomes Consortium, 2010*). O principal objetivo era caracterizar mais de 95% das variantes genéticas com frequência alélica igual ou superior a 1% e também estudar alelos de baixa frequência (< 0,1%) nos cinco maiores grupos da população mundial: Europa, Ásia este, Ásia sul, África oeste e América (*The 1000 Genomes Consortium, 2010*). Os primeiros e segundos resultados do projeto 1000 genomas foram publicados em 2010 e em 2012, respetivamente. A segunda geração de resultados revela que através da análise de 1092 indivíduos em 14 populações diferentes, referidas anteriormente, foram identificados 38 milhões de SNPs, 1,4 milhões de pequenas inserções e deleções e 14 milhões de grandes deleções (*The 1000 Genomes Project Consortium, 2012*). Este estudo demonstrou também que existem perfis diferentes das variantes comuns e raras entre indivíduos de populações diferentes e está em curso o estudo de mais 1500 indivíduos de 12 populações diferentes até à sua conclusão. A informação proveniente dos projetos referidos anteriormente permitiram o desenvolvimento de novas estratégias a utilizar nos estudos genéticos, particularmente no estudo de doenças complexas. O estudo genético de doenças complexas é difícil face ao número de fatores genéticos e ambientais envolvidos na sua fisiopatologia, particularmente na PDAH.

1.5.3. Estratégias para o mapeamento de genes

Para o mapeamento de genes utilizam-se os estudos de *linkage* e de associação. Os estudos de *linkage* são importantes para a identificação de genes *major*. Contudo, nas doenças complexas existem vários genes de suscetibilidade e os estudos de associação são os mais aconselhados face ao seu poder estatístico para a identificação de genes *minor*. Atualmente, os estudos de associação podem ser divididos em estudos de genes candidatos e em GWAS. Os GWAS consistem na genotipagem de todo o genoma utilizando um elevado número de SNPs (Ott et al., 2011; Sahebi et al., 2013). Por outro lado, os estudos de associação com genes candidatos focam-se na investigação de um gene específico (Sahebi et al., 2013) e podem subdividir-se em dois grupos: os estudos casos-controlo e com base em famílias (Figura 5). De referir que um gene candidato consiste num gene que codifica uma proteína que pode estar de uma forma direta ou indireta implicada no mecanismo de fisiopatologia de uma determinada patologia.

Nos estudos casos-controlo compara-se uma amostra de indivíduos controlo e uma amostra de indivíduos com a patologia, tendo em conta idades, sexo e grupo étnico. De facto, a estratificação da população revela-se um grande problema associado aos estudos caso-controlo, podendo levar à ocorrência de falsos-positivos.

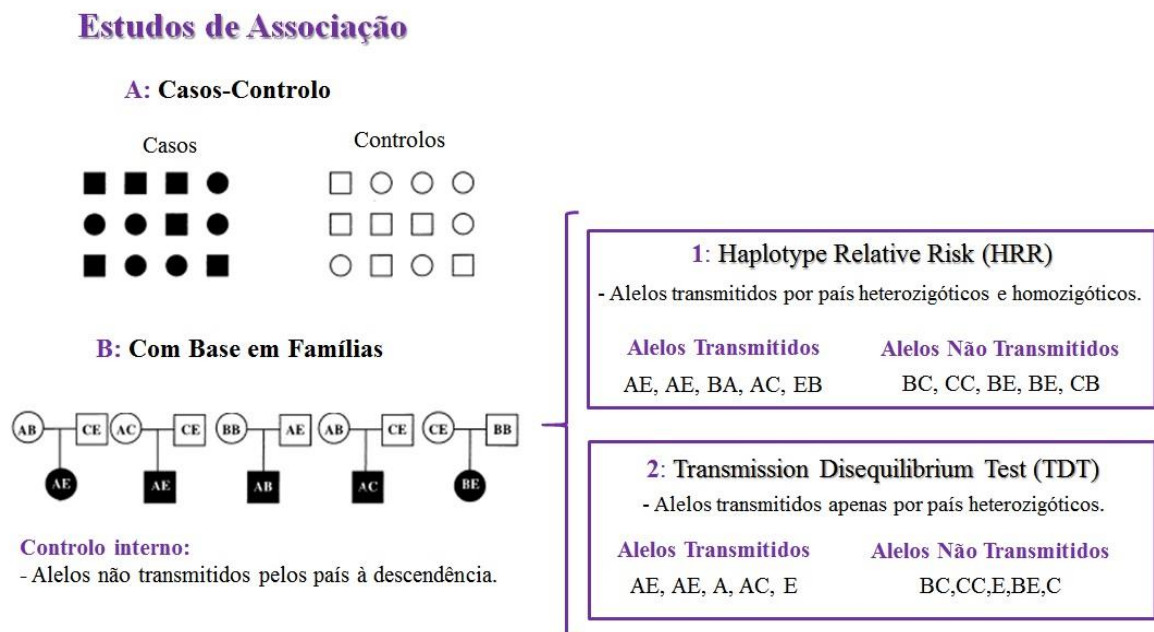


Figura 5: Estratégias de estudos de associação: casos-controlo (A) e com base em trios (B). Nos estudos de associação com base em trios existem duas estratégias diferentes sendo elas a HRR (1) e TDT (2) (Adaptado de Burmeister, 1999).

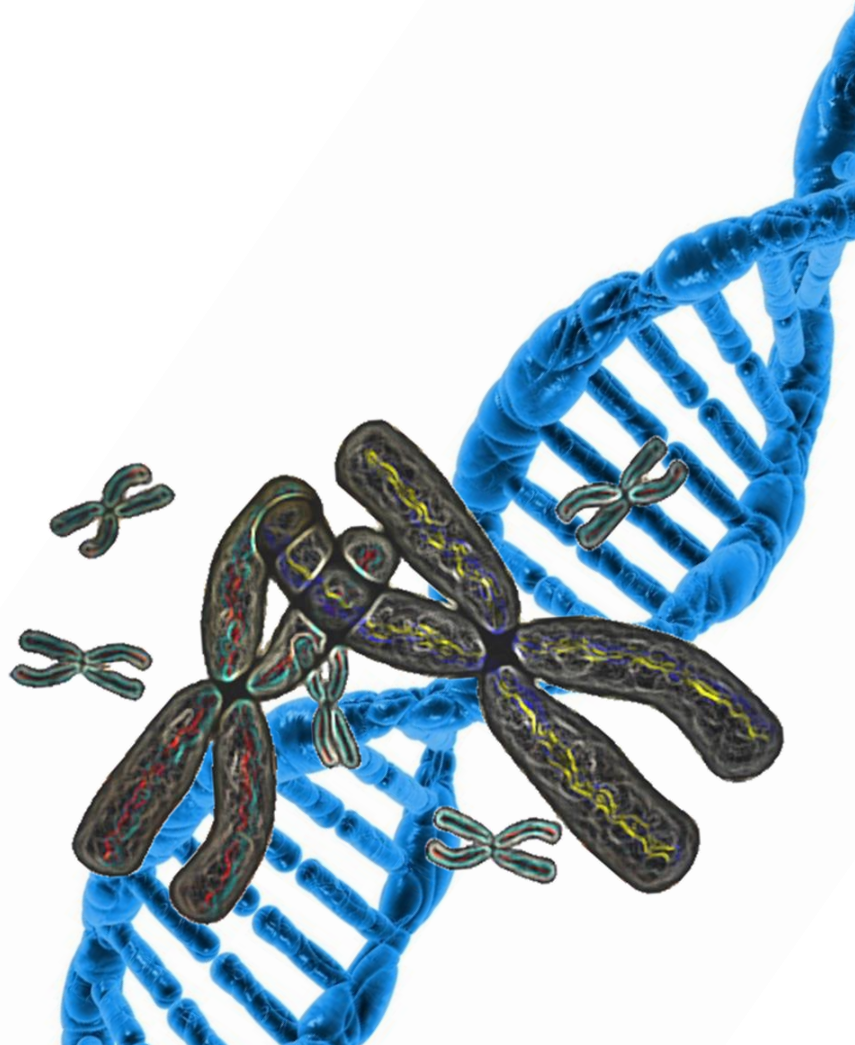
As estratégias de associação com base em trios, designadas de *Haplotype Relative Risk* (HRR) (Falk e Rubinstein, 1987; Terwilliger e Ott, 1992) e *Transmission Disequilibrium Test* (TDT) (Spielman et al., 1993), permitem contornar o conceito de estratificação inerente aos estudos caso-controlo, uma vez que ambas avaliam a transmissão de alelos entre os progenitores e o probando, funcionando como controlos, os alelos não transmitidos pelos pais. Na estratégia HRR utilizam-se pais homocigóticos e heterocigóticos de trios (Terwilliger e Ott, 1992), enquanto na estratégia TDT utilizam-se apenas pais heterocigóticos (Spielman et al., 1993).

Conclui-se então que ambas as estratégias permitem avaliar se um determinado alelo é fator de risco para a patologia em estudo e a sua utilização conjunta permite uma análise mais completa e correta dos resultados obtidos. Assim, se um determinado gene apresentar associação com a patologia em ambos os testes HRR e TDT, conclui-se que possivelmente estamos perante um gene de suscetibilidade para a doença. Por outro lado, se ambas as estratégias apresentarem resultados negativos, conclui-se que o gene em estudo não está implicado na patologia.

1.6. Objectivo

O sistema neurotrófico tem sido implicado na etiologia da PDAH, particularmente a neurotrofina BDNF e o recetor $p75^{NTR}$. Uma vez que na população portuguesa não existem estudos genéticos relacionados com o sistema neurotrófico, o objetivo deste trabalho consistiu em investigar os polimorfismos Val66Met do gene *BDNF* e S205L do gene *p75^{NTR}* na etiologia da PDAH, utilizando a estratégia do HRR e do TDT, numa amostra de trios da população portuguesa. Face às diferenças de género e subtipos da PDAH realizaram-se as respetivas análises, através das estratégias HRR e TDT.

Materiais e Métodos



2. Materiais e Métodos

2.1. Seleção da amostra

A seleção da amostra de trios- crianças com PDAH, de ambos os sexos, com idades a partir dos 6 anos e os seus progenitores, foi efetuada na consulta do Centro de Desenvolvimento da Criança Luís Borges do Hospital Pediátrico de Coimbra. Os critérios de inclusão incluem crianças com QI superior ou igual a 80, diagnosticadas com PDAH que preencheram os critérios da DSM-IV em pelo menos dois contextos e foram avaliados por um mínimo de dois avaliadores independentes. Os critérios para a PDAH, a inteligência normal e comorbilidade foram avaliados a partir de entrevistas estruturadas com base nos critérios DSM-IV-TR de PHDA, de *Wechsler Intelligence Scale for Children*, versão 3 (WISC III) e de questionários comportamentais para pais e professores (Conners, Child Behavior Checklist e Kiddie-SADS-PL). Neste estudo foram incluídos os três subtipos da doença intento, hiperativo-impulsivo e misto. Todas as crianças em estudo foram submetidas a testes com o objetivo de excluir crianças com desatenção e/ou hiperatividade-impulsividade secundárias a outras patologias médicas, nomeadamente crianças com antecedentes de lesões cerebrais traumáticas significativas, epilepsia, tumor cerebral, malformações congénitas ou anomalias estruturais do sistema nervoso central. Crianças com problemas do foro psiquiátrico, do neurodesenvolvimento ou com outros fatores que poderiam interferir significativamente com as habilidades de atenção foram também excluídas do estudo.

As amostras foram recolhidas após consentimento informado por escrito dos pais das crianças e para o isolamento do DNA genómico foi retirada uma amostra de 10 ml de sangue periférico para tubos contendo o anticoagulante etilenodiaminotetracético (EDTA). O Projeto foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. De uma amostra total de 178 trios, foram selecionados 108 trios completos (progenitores e probando) e estratificada por género: 23 trios do sexo feminino; 85 trios do sexo masculino.

2.2. Extração de DNA

A extração do DNA genómico pode ser realizada através de métodos enzimáticos e não enzimáticos (fenol-clorofórmio e *salting-out*). O método enzimático apresenta vantagens perante o método fenol-clorofórmio, uma vez que este utiliza fenol que interfere na amplificação e digestão do DNA genómico. Assim, a extração do DNA

genômico foi efetuada a partir de leucócitos de sangue periférico, contendo como anticoagulante EDTA, através do método enzimático adaptado de Miller et al. (1988).

A 10 mL de sangue, adicionaram-se 30 mL de solução *Red Blood Cell Lysis Buffer* – RBC (NH_4Cl 155 mM, KHCO_3 10 mM, $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mM; pH 7,4) (Sigma) e a amostra foi colocada em gelo durante 20 minutos. Posteriormente, realizou-se uma centrifugação a 4°C durante 15 min a 2500 rpm numa centrífuga refrigerada (Rotanta 460R - Hettich). De seguida, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 20 mL de solução RBC, a qual foi centrifugada a 2500 rpm, durante 15 min a 4°C. No final da centrifugação, o sobrenadante foi novamente descartado e adicionaram-se 4 mL de solução *Nuclei Lysis Buffer* – NLB (Tris-HCl 10 mM, NaCl 400 mM, $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 mM; pH 8) (Sigma), 250 μL de dodecil sulfato de sódio – SDS a 10% (Sigma), 30 μL de proteinase K (20 mg/mL) (Roche) e incubou-se a amostra a 37°C com agitação constante (Stuart Scientific Incubador S106D) durante a noite (Figura 6).

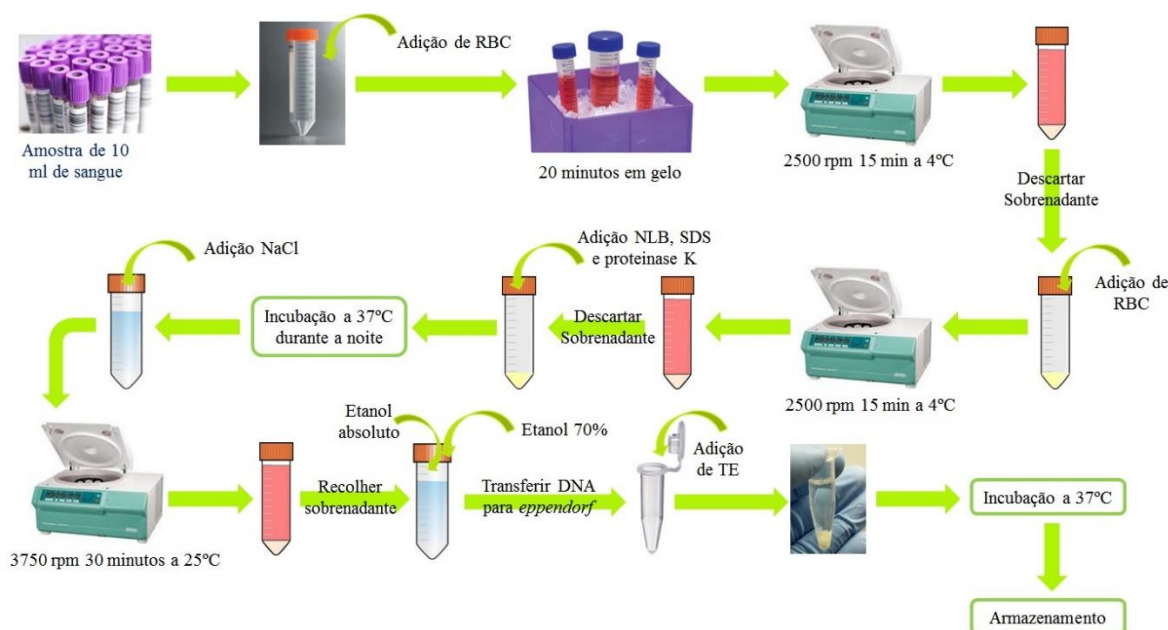


Figura 6: Representação esquemática do método enzimático de extração de DNA.

Após o período de incubação referido, adicionou-se 3 mL de uma solução saturada de Cloreto de Sódio (NaCl 6M), de modo a promover a precipitação das proteínas, e realizou-se uma centrifugação a 3750 rpm durante 30 minutos, a 25°C. De seguida, recolheu-se o sobrenadante e para precipitação do DNA, adicionou-se etanol absoluto frio num volume correspondente ao dobro do volume da amostra. Ao DNA obtido adicionou-se etanol a 70% para lavagem do mesmo e este foi retirado com uma ansa para um

ependorf ao qual se adicionou Tris-EDTA (Tris-HCl 10m M, Na₂EDTA.2H₂O 1 mM; pH 8). O DNA foi colocado a 37°C com agitação constante para permitir a sua total dissolução e finalmente armazenado para posterior utilização na genotipagem.

2.3. Quantificação de DNA

Para se quantificar e avaliar o grau de pureza do DNA, procedeu-se às leituras das absorvâncias por espectrofotometria. A presença de DNA foi verificada pela leitura de absorvância a 260 nm, uma vez que as bases azotadas do DNA absorvem maximamente neste comprimento de onda. As amostras foram previamente diluídas num fator de diluição de 25 vezes em H₂O MiliQ autoclavada e homogeneizadas através da agitação no vortéx (IKA MSI Minishaker). A leitura das absorvâncias foi realizada num espectrofotómetro Bio-Rad SmartSpec Plus (Figura 7) após a colocação das amostras numa cuvette de quartzo e a concentração de DNA foi determinada, utilizando a constante de dupla hélice de 50 ng/μL, pela seguinte expressão (Nicklas e Buel, 2003):

$$[DNA] \left(\frac{ng}{\mu l} \right) = Abs\ 260\ nm \times 50 \frac{ng}{\mu l} \times fator\ de\ diluição$$



Figura 7: Espectrofotómetro Bio-Rad SmartSpec Plus utilizado na quantificação do DNA.

Para avaliar o grau de pureza e a qualidade das amostras efetuou-se também a leitura da absorvância a 280 nm, visto que os resíduos aromáticos existentes nas proteínas absorvem neste comprimento de onda. Desta forma, é possível avaliar pelo rácio Abs_{260nm}/Abs_{280nm} o grau de pureza da amostra e para valores inferiores a 1,5 a

amostra está contaminada por proteínas, enquanto que para valores superiores a 2,0 está contaminada com RNA.

2.4. Amplificação e digestão dos fragmentos de DNA

2.4.1. Conceitos Gerais

2.4.1.1. *Polymerase Chain Reaction* - PCR

A técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é um método *in vitro* rápido, versátil e extremamente sensível para amplificar sequências de DNA e foi descoberto pela primeira vez, em 1984, pelo bioquímico Kary Mullis (Mullis, 1990). A PCR consiste numa reação em cadeia onde dois filamentos de DNA servem como moldes na síntese das novas cadeias de DNA durante os ciclos sequenciais (Sambrook e Russell, 2001; Garibyan e Avashia, 2013). Normalmente, a PCR é utilizada para amplificar de forma seletiva uma determinada sequência alvo de DNA. Esta amplificação seletiva apenas é possível se se conhecer as sequências de nucleótidos das regiões anteriores e posteriores ao fragmento que se pretende estudar, para que sejam desenhados conjuntos de aproximadamente 15-25 nucleótidos complementares e específicos (*primers*) para estas regiões, delimitando a sequência alvo (Sambrook e Russell, 2001; Strachan e Read, 2011).

A *mix* utilizada na técnica de PCR inclui, além dos *primers*, os seguintes constituintes: *buffer*, iões divalentes (normalmente Mg^{2+}), enzima DNA polimerase termoestável (normalmente a *Taq DNA Polimerase*) e dNTPs – desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dTTP e dGTP). O *buffer* permite manter constante o pH e a força iónica durante o processo de amplificação do DNA, enquanto que o Mg^{2+} é cofator da DNA polimerase. Esta enzima catalisa a reação de inserção dos dNTPs na nova molécula de DNA formada e tem que apresentar uma excelente estabilidade às elevadas temperaturas a que ocorrem as fases dos ciclos de PCR (Sambrook e Russell, 2001). Cada ciclo de PCR divide-se nas seguintes fases (Figura 8):

Desnaturação – Nesta fase há aumento da temperatura para valores superiores a 90°C e ocorre a separação da cadeia dupla de DNA em dois filamentos. Essa separação deve-se à quebra das ligações de hidrogénio (ligações fracas) entre as cadeias da molécula de DNA devido às temperaturas atingidas nesta fase. As ligações entre as moléculas de fosfato e desoxirribose mantêm-se intactas por serem ligações mais fortes.

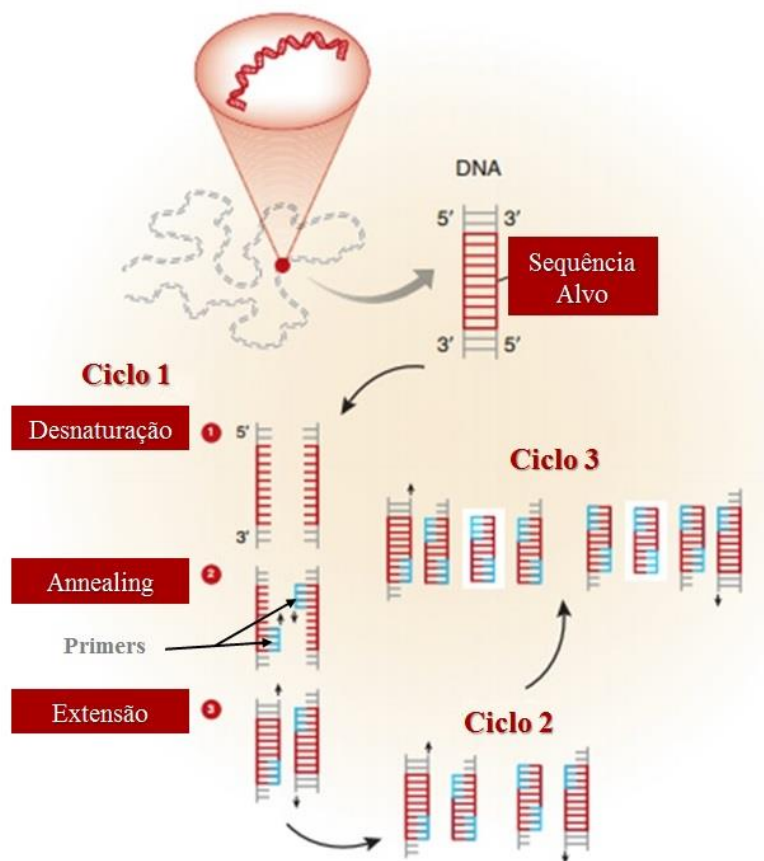


Figura 8: Técnica de PCR: desnaturação do DNA, ligação dos *primers* (*annealing*) e a extensão da nova cadeia de DNA. (Adaptada de Garibyan e Avashia, 2013).

Hibridização ou *Annealing* dos *primers* – Nesta fase ocorre a ligação (hibridização) dos *primers* à região complementar da cadeia molde de DNA produzida na fase anterior. A temperatura de *annealing* encontra-se entre 50-70 °C e é crucial que seja obtida de forma rigorosa, no sentido de permitir uma hibridização específica dos *primers* com a sequência alvo.

Extensão – Após a fase de *annealing*, a temperatura é aumentada para 72°C de forma a permitir que a *Taq DNA polimerase* realize a extensão da cadeia de DNA através da incorporação dos dNTPs presentes na solução.

Na realização do PCR existem vários parâmetros que afetam a especificidade e eficiência da amplificação do DNA, sendo eles: concentração de *Taq DNA Polimerase*, desenho dos *primers* utilizados, concentração de dNTPs, concentração dos íons divalentes, concentração de *buffer* e de DNA que se pretende amplificar. Desta forma, é

necessário otimizar todos os parâmetros referidos para que se obtenha a maior quantidade de DNA amplificado e sem produto inespecífico (Sambrook e Russell, 2001).

2.4.1.2. Enzimas de Restrição

As enzimas de restrição são endonucleases com a capacidade de reconhecer e clivar sequências específicas na dupla cadeia de DNA (Sambrook e Russell, 2001). Estas enzimas apresentam uma vasta gama de aplicações, particularmente na biologia e genética molecular. Assim, após a amplificação do DNA, os fragmentos amplificados são colocados a digerir com uma enzima de restrição específica para o polimorfismo em questão e, os fragmentos de restrição resultantes são facilmente analisados em electroforese em gel de agarose ou poliacrilamida (Sambrook e Russell, 2001).

2.4.1.3. Eletroforese

A electroforese em gel de agarose ou em gel de poliacrilamida é utilizada para separar e identificar fragmentos de DNA, visto ser uma técnica simples, rápida e de fácil execução. O gel de agarose apresenta uma maior amplitude de separação do que o gel de poliacrilamida, embora a resolução deste último seja mais elevada. Os fragmentos de DNA acima dos 50 pares de bases (pb) podem ser separados em géis de agarose e apresentam uma boa resolução quando corridos na horizontal em campo elétrico e direção constante (Sambrook e Russell, 2001). A separação dos fragmentos de DNA deve-se à presença do campo elétrico e direção constante aplicada, uma vez que a pH neutro o DNA migra para o pólo positivo, devido à sua carga superficial negativa conferida pelos seus grupos fosfato. É importante referir que o diâmetro dos poros do gel de agarose ou poliacrilamida é inversamente proporcional à concentração do gel utilizada e que a velocidade de migração varia consoante o peso molecular do fragmento de DNA, uma vez que quanto maior o tamanho do fragmento de DNA menos este irá migrar no gel.

Na electroforese utilizam-se vários tampões, particularmente o TBE (Tris Borato EDTA) que permite manter o pH constante durante a mesma e inibir enzimas, como nucleases, enzimas restrição ou DNA polimerases que possam estar presentes na solução, uma vez que o EDTA é um agente quelante de catiões metálicos, particularmente o Mg^{2+} (Sambrook e Russell, 2001). Além do tampão, adiciona-se brometo de etídio para se detetar posteriormente o DNA no gel. Estes compostos vão intercalar-se nas bases da dupla cadeia de DNA e desta forma é possível visualizá-lo num Gel Doc através da

incidência de radiação UV. Às amostras adiciona-se um corante que lhes confere densidade e ajuda na visualização das bandas formadas no gel.

2.4.2. Metodologia de genotipagem: Genes *BDNF* e *p75^{NTR}*

2.4.2.1. Polimorfismo Val66Met do gene *BDNF*

2.4.2.1.1. Amplificação do fragmento de DNA

O polimorfismo Val66Met encontra-se localizado no gene *BDNF* e consiste na substituição de uma Guanina por uma Adenina, resultando numa alteração de uma Valina (Val) por uma Metionina (Met) na proteína. Este SNP foi estudado através de um protocolo adaptado de Neves-Pereira et al (2002), tendo sido realizada inicialmente a desnaturação de 125 ng de DNA genómico a 95°C, durante 5 minutos. De seguida, fez-se o volume final de 25 µl adicionando uma *mix* de PCR contendo os seguintes reagentes: *buffer* 1x, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 200 µM, *primers* 0,4 µM e 0,04 U/µL de *Taq DNA Polimerase*. Os *primers* utilizados na amplificação do DNA foram os seguintes:

Primer Foward - 5'-GAGGCTTGACATCATTGGCT-3';

Primer Reverse - 5'-CGTGTACAAGTCTGCGTCCT-3'

Seguidamente realizaram-se 30 ciclos de PCR no termociclador (Applied Biosystems), com as seguintes condições:

- **Desnaturação:** 94°C durante 30 segundos;
- **Annealing dos primers:** 60°C durante 30 segundos;
- **Extensão da cadeia de DNA:** 72°C durante 30 segundos.

Após estes ciclos ocorreu uma extensão final dos fragmentos de DNA a 72°C durante 5 minutos.

2.4.2.1.2. Digestão e eletroforese em gel de agarose

O produto amplificado de 113 pb foi digerido durante a noite a 37 °C, pela enzima de restrição Eco72I (MBI, Fermentas) (Neves-Pereira et al, 2002) (Figura 9), após ter sido testado 5µl de DNA amplificado num gel de agarose a 2 %.



Figura 9: Local de clivagem da enzima de restrição Eco72I.

Posteriormente, adicionou-se a cada amostra uma solução corante de azul bromofenol (0,05 m/v), xileno cianol (0,05 m/v) e glicerol (30% v/v) e avaliou-se o padrão de digestão recorrendo a um gel de agarose a 3,5%, contendo brometo de etídio (10 mg/mL). A eletroforese decorreu num tampão de eletroforese TBE 1x (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM, Na₂EDTA.2H₂O 2 mM) a uma voltagem de 100V, e ao gel foi também adicionado um marcador de peso molecular de 100 pb (Gene Ruler 100 pb DNA Ladder, Thermo Scientific), o qual permite determinar os tamanhos dos fragmentos de DNA obtidos. A visualização do gel foi realizada num Gel Doc (Bio-Rad).

2.4.2.2. Polimorfismo S205L do gene *p75^{NTR}*

2.4.2.2.1. Amplificação do fragmento de DNA

O polimorfismo S205L encontra-se localizado no exão 4 do gene *p75^{NTR}* e para o estudo deste SNP, inicialmente, desnaturaram-se 50 ng de DNA genómico a 95°C durante 10 minutos, segundo o protocolo de Kunugi et al (2004), com algumas alterações. Para a amplificação do DNA, utilizou-se uma *mix* de PCR que contém *buffer* 1x, MgCl₂ 1,25 mM, dNTPs 100 µM, *primers* 0,2 µM, *Taq DNA Polimerase* 0,04 U/µL, perfazendo o volume final de 25 µL. Os *primers* utilizados na amplificação foram os seguintes:

Primer Foward - 5`-GCTAAAAGGGAGGAGTGGGGGAAG-3`;

Primer Reverse - 5`-TTCAGGTCAAGGTCACAGCAAAGTCT-3`.

A amplificação dos fragmentos de DNA ocorreu num termociclador (Bio-Rad) durante 35 ciclos com os seguintes parâmetros:

- **Desnaturação:** 95°C durante 30 segundos;
- **Annealing dos primers:** 58°C durante 20 segundos;
- **Extensão da cadeia de DNA:** 72°C durante 30 segundos.

Após os ciclos de PCR, o passo final de extensão ocorreu a 72°C durante 3 minutos.

2.4.2.2.2. Digestão e eletroforese em gel de agarose

Após a amplificação, testou-se 5 µl de DNA amplificado num gel de agarose a 2%. Posteriormente, o produto amplificado de 386 pb foi digerido pela enzima de restrição BanII (New England Biolabs) (Figura 10) durante a noite a 37°C (Kunugi et al., 2004).

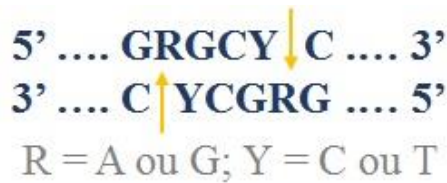


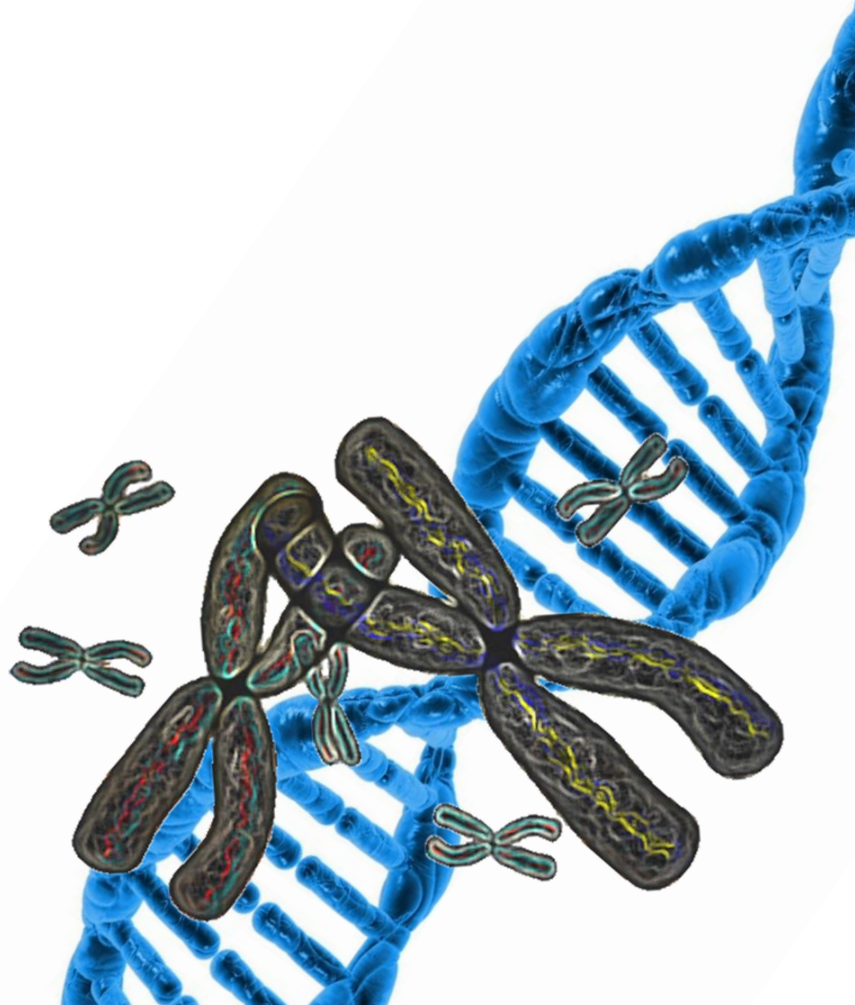
Figura 10: Local de clivagem da enzima de restrição BanII. R= Adenina ou Guanina; Y= Citosina ou Timina.

A cada amostra adicionou-se uma solução corante de azul bromofenol a 0,05 m/v e 30% v/v de glicerol e os fragmentos de restrição foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 3%, previamente corado com brometo de etídio (10 mg/ml), a uma voltagem de 90V. O tampão de eletroforese utilizado foi o TBE 1x (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM, Na₂EDTA.2H₂O 2 mM) e adicionou-se ao gel também um marcador de peso molecular de 100 pb (Gene Ruler 100 pb DNA Ladder, Thermo Scientific) para determinação do tamanho dos fragmentos de DNA obtidos, após a visualização do gel num Gel Doc (Bio-Rad).

2.5. Análise Estatística

A análise estatística dos resultados dos estudos de associação em trios foi realizada por dois métodos, nomeadamente o HRR (Terwilliger e Ott, 1992) e o TDT (Spielman et al., 1993). No que se refere à estratégia HRR, como mencionado anteriormente, esta utiliza pais quer sejam homocigóticos ou heterocigóticos e determinam-se os alelos transmitidos (T) e os não transmitidos (NT) por estes ao probando (Terwilliger e Ott, 1992). Os alelos não transmitidos (NT) pelos pais funcionam como controlo. Relativamente ao TDT este utiliza somente trios nos quais os pais são heterocigóticos e determina-se também os alelos transmitidos (T) e não transmitidos (NT), funcionando, à semelhança da estratégia HRR, os alelos não transmitidos (NT) como controlos. Na estratégia do HRR utilizam-se tabelas de contingência 2x2 e o χ^2 é determinado segundo a expressão seguinte: $\chi^2 = \sum((O - E)^2/E)$. A estratégia do TDT utiliza também tabelas de contingência 2x2 e o teste de McNemar (Spielman et al., 1993) para determinação do χ^2 : $\chi^2 = (a - b)^2/(a + b)$. No sentido de se analisar diferenças de género e subtipos da patologia PDAH procedeu-se também à análise utilizando as estratégias do HRR e TDT.

Resultados e Discussão



3. Resultados e discussão

3.1. Estudo de associação entre o polimorfismo do gene *BDNF* e a PDAH

3.1.1. Polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* e PHDA

O sistema neurotrófico tem sido associado na fisiopatologia da PDAH e entre as várias neurotrofinas, o BDNF é promissor face à sua ação a nível neuronal e atividade moduladora de vários sistemas de neurotransmissores, que têm sido associados à PDAH. A nível mundial, o gene *BDNF* tem sido implicado na etiologia da PDAH, em várias populações mundiais. Contudo não existem estudos genéticos na população portuguesa. Assim, com o objetivo de investigar o gene *BDNF* na etiologia da PDAH na população portuguesa, procedeu-se à amplificação de um fragmento de DNA, no qual se localiza o polimorfismo Val66Met que consiste na alteração de um nucleótido de Guanina por uma Adenina na posição 196 do gene *BDNF* (Figura 11), resultando na troca de uma Valina (Val) por uma Metionina (Met) no pró-domínio da proteína.

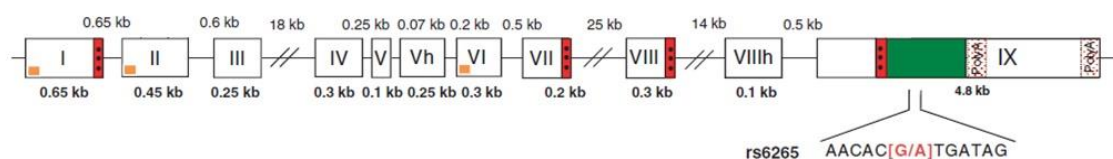


Figura 11: Esquema e localização do polimorfismo Val66Met no gene *BDNF*. Os exões estão representados pelos números romanos de I-IX; o polimorfismo Val66Met (rs6265) está localizado no exão IX do gene *BDNF* (adaptado de Boulle et al., 2012).

Segundo o protocolo descrito no ponto 2.4.2.1.1 de Material e Métodos, o fragmento de DNA amplificado por PCR é constituído por 113 pb e está representado na eletroforese da Figura 12.

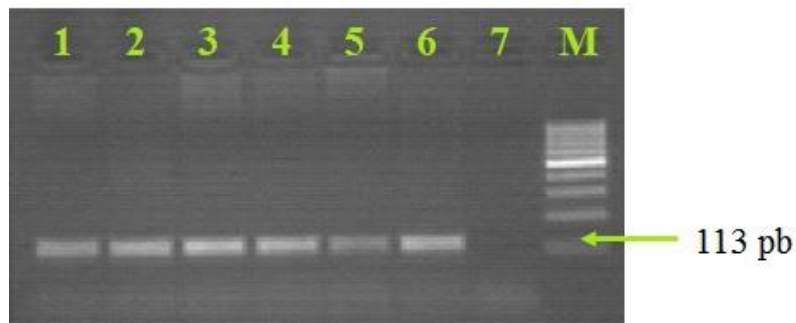


Figura 12: Eletroforese em gel de agarose a 2% para testar a amplificação do fragmento de 113 pb relativo ao polimorfismo Val66Met do gene *BDNF*. Legenda: 1 a 6 - produto de amplificação de várias amostras; 7 - controlo negativo; M - marcador de peso molecular de 100 pb (Gene Ruler 100 pb DNA Ladder, Thermo Scientific).

Posteriormente, colocaram-se as amostras de DNA amplificadas a digerir com a enzima de restrição *Eco72I* e obtiveram-se os fragmentos de 35 pb e 78 pb, que correspondem a indivíduos homozigóticos Val/Val. Fragmentos de DNA com 35 pb, 78 pb e 113 pb correspondem a indivíduos heterozigóticos Val/Met, enquanto o fragmento com 113 pb corresponde a indivíduos homozigóticos Met/Met (Figura 13).



Figura 13: Perfil eletroforético do polimorfismo Val66Met do gene *BDNF*, em gel de agarose a 3,5%, após digestão com a enzima de restrição *Eco72I*. Legenda: 1,7,8,9,10,13,14,15 e 16 correspondem a indivíduos homozigóticos para o alelo Val (Val/Val); 3,4,6,11,12,17,18 e 19 correspondem a indivíduos heterozigóticos (Val/Met); 2 e 5 correspondem a indivíduos homozigóticos para o alelo Met (Met/Met). M representa o marcador de peso molecular de 100 pb (Gene Ruler 100 pb DNA Ladder, Thermo Scientific).

3.1.2. Amostra total de trios: Polimorfismo Val66Met do gene BDNF e PHDA

Como referido anteriormente, pela estratégia HRR avaliam-se os alelos transmitidos (T) e não transmitidos (NT) pelos pais homocigóticos e heterocigóticos para o probando, sendo que os alelos não transmitidos (NT) funcionam como controlo. Os resultados referentes à análise HRR para a amostra total de trios estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 - Polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* na amostra total de trios: estratégias HRR e TDT

Amostra total	HRR			TDT		
	T	NT	Total	T	NT	Total
Alelo Met66	43	30	73	37	24	61
Alelo Val66	143	156	299	24	37	61
Total	186	186	372	61	61	122
	$\chi^2= 2,454; df=1; p=0,117$			$\chi^2= 2,770; df=1; p=0,096$		

Como se verifica na Tabela 1, a estratégia do HRR, não revelou associação entre o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* e a PDAH na amostra de trios estudada ($\chi^2= 2,454; df=1; p=0,117$).

Em relação à estratégia do TDT, somente se utiliza pais heterocigóticos e, à semelhança da estratégia do HRR, determinam-se os alelos transmitidos (T) e não transmitidos (NT), funcionam estes últimos como controlo. Procedeu-se à análise estatística e os resultados obtidos pela estratégia do TDT representados na Tabela 1 não revelaram diferenças estatisticamente significativas entre os alelos transmitidos (T) e não transmitidos (NT) ($\chi^2= 2,770; df=1; p=0,096$). No entanto, no sentido de esclarecer o resultado obtido ($p= 0,096$) é importante a realização de um estudo com uma amostra de trios maior da população portuguesa.

Para a amostra total de trios, os resultados obtidos pelas estratégias HRR e TDT parecem sugerir que o gene *BDNF* não apresenta um papel direto na etiologia da PDAH. Estes resultados estão de acordo com outros estudos genéticos realizados em amostras de trios de diferentes populações mundiais, nomeadamente tailandesa, alemã, inglesa e

canadiana (Lee et al., 2007; Schimmelmann et al., 2007; Xu et al., 2007; Tzang et al., 2013), os quais não revelaram associação entre o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* e a PDAH. Três estudos caso-controlo também revelaram resultados negativos na população chinesa, coreana e alemã (Friedel et al., 2005; Cho et al., 2010; Li et al., 2014b). Para além disso, duas meta-análises também não revelaram associação entre o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* e a PDAH numa amostra de indivíduos de populações de diferentes países (Sánchez-Mora et al., 2010; Lee e Song, 2015). Contrariamente, um estudo caso-controlo (Aureli et al., 2010) e dois estudos com base em trios (Kent et al., 2005; Lanktree et al., 2008) revelaram associação entre o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* e a PDAH, que pode ser devida ao número de amostras estudadas e à heterogeneidade entre as populações estudadas. De referir ainda que o alelo Val66 apresenta uma maior prevalência pela estratégia do TDT utilizada nos estudos de Lanktree e colegas (2008) e Kent e colaboradores (2005), verificando-se o oposto no nosso trabalho (alelo Met66), utilizando a mesma estratégia.

Embora os resultados obtidos não revelem associação entre a PDAH e o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF*, é importante continuar este estudo uma vez que, particularmente com a estratégia do TDT, o resultado obtido ($p=0,096$) carece de estudos adicionais no sentido de se esclarecer o papel do gene *BDNF* na etiologia da PDAH. A neurotrofina BDNF está associada a vias de sinalização celular, que promovem a sobrevivência e diferenciação neuronal, e modula os sistemas dopaminérgico, serotoninérgico e noradrenérgico (Autry e Monteggia, 2012) que têm sido associados à PDAH. Além disso, uma vez que o BDNF é expresso na região do córtex cerebral (Liu et al., 2014) e disfunção nesta região está associada à expressão da patologia, alterações genéticas no gene *BDNF* podem afetar a função desta neurotrofina, que por sua vez leva a disfunções nesta região cerebral. De facto, o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF*, que consiste na alteração de uma Guanina por uma Adenina na posição 196 deste gene, resultando na troca de uma valina por uma metionina no pró-domínio da proteína, tem sido associado a disfunções no armazenamento, libertação e distribuição da molécula de BDNF *in vitro* (Egan et al., 2003). Verificou-se ainda que o alelo Met66 está associado a uma alteração no armazenamento do proBDNF e a uma diminuição da libertação da molécula madura de BDNF (Chen et al., 2004). É importante também referir que estudos com crianças com PDAH revelaram níveis mais elevados da neurotrofina BDNF no plasma das mesmas comparativamente aos controlos (Shim et al., 2008; Li et al., 2014b).

3.1.3. Análise de género: Polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* e PHDA

Face à diferença que existe de género na PDAH, na qual a prevalência de indivíduos do sexo masculino é maior comparativamente ao feminino (3/1), procedeu-se à análise de género, estratificando a amostra total de trios com o objetivo de se investigar possíveis diferenças na população portuguesa. Relativamente ao sexo feminino os resultados estão presentes na Tabela 2 e não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os alelos transmitidos (T) e não transmitidos (NT) em ambas as estratégias (HRR - $\chi^2= 1,953$; $df=1$; $p=0,162$; TDT - $\chi^2= 3,000$; $df=1$; $p=0,083$). O resultado obtido na estratégia do TDT é inconclusivo, face ao número de trios informativos utilizados, carecendo de um estudo adicional com uma amostra de trios maior.

Tabela 2 - Polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* na amostra de trios relativa ao sexo feminino: estratégias HRR e TDT

Amostra total sexo feminino	HRR			TDT		
	T	NT	Total	T	NT	Total
Alelo Met66	11	5	16	9	3	12
Alelo Val66	29	35	64	3	9	12
Total	40	40	80	12	12	24
$\chi^2= 1,953$; $df=1$; $p=0,162$			$\chi^2= 3,000$; $df=1$; $p=0,083$			

Como representado na Tabela 3, para o sexo masculino também não se obteve associação entre o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* e a PDAH para ambas as estratégias utilizadas (HRR - $\chi^2= 0,785$; $df=1$; $p=0,376$; TDT - $\chi^2= 1,000$; $df=1$; $p=0,317$).

Tabela 3 -Polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* na amostra de trios relativa ao sexo masculino: estratégias HRR e TDT

Amostra total sexo masculino	HRR			TDT		
	T	NT	Total	T	NT	Total
Alelo Met66	32	25	57	28	21	49
Alelo Val66	114	121	235	21	28	49
Total	146	146	292	49	49	98
	$\chi^2=0,785; df=1; p=0,376$			$\chi^2=1,000; df=1; p=0,317$		

De referir que embora no nosso estudo não exista associação entre o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* e a PDAH, para o sexo feminino observou-se uma maior transmissão do alelo Met66 dos progenitores para o probando, utilizando a estratégia do TDT, resultado semelhante ao observado num estudo com trios da população coreana utilizando a mesma estratégia (Cho et al., 2010). Um estudo caso-controlo com crianças chinesas revelou uma maior frequência do alelo Val66 para os indivíduos do sexo feminino, sugerindo que no sexo feminino este alelo é fator de risco para a PDAH (Li et al., 2014b). Esta diferença de resultados pode dever-se às variações genéticas entre as populações, à estratégia utilizada e ao tamanho da amostra estudada.

Relativamente à análise de género, uma meta-análise utilizando amostras de quatro populações europeias (Sánchez-Mora et al., 2010) e um estudo caso-controlo com crianças com PDAH da população coreana, não revelaram associação entre o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* e a PDAH para o sexo feminino. No entanto, como referido anteriormente, estudos em crianças revelaram aumento dos níveis de *BDNF* no plasma de crianças com a patologia (Shim et al., 2008; Li et al., 2014b). Verificou-se também que para o sexo feminino, o alelo Val66 e o genótipo Met66/Met66 estão associados a níveis mais baixos e mais elevados de *BDNF* no plasma de crianças com o PDAH, respetivamente (Li et al., 2014b). De facto, o alelo Met66 está associado a alterações ao nível do armazenamento e da libertação da neurotrofina madura de *BDNF*, podendo ter repercussões na função desta molécula no sistema biológico. Uma vez que o *BDNF* regula vias de sinalização intracelular e é modelador de vários sistemas de neurotransmissão implicados na PDAH, níveis mais elevados de *BDNF* no plasma de crianças com PDAH com genótipo Met66/Met66 podem dever-se a uma maior expressão do *BDNF* no organismo para colmatar as alterações induzidas pelo alelo Met66.

Relativamente ao sexo masculino, não se conhecem estudos com base em trios efetuados em outras populações mundiais, e uma meta-análise (Sánchez-Mora et al., 2010) e três estudos caso-controlo (Conner et al., 2008; Cho et al., 2010; Li et al., 2014b) são negativos para o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF*.

Em suma, a análise de género efetuada na amostra da população portuguesa estudada não revelou associação entre o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* e a PDAH. Contudo, é importante a continuação do estudo da análise de género, numa amostra maior de trios no sentido de se esclarecer o resultado inconclusivo obtido para o sexo feminino.

3.1.4. Análise de subtipo: Polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* e PHDA

À semelhança da análise de género, a amostra total de trios foi estratificada por subtipo de PDAH. No entanto, tendo em conta o número reduzido de trios para o subtipo hiperativo-impulsivo, optou-se por apenas se apresentar os resultados dos subtipos inatento e misto.

Em relação ao subtipo inatento, os resultados obtidos estão presentes na Tabela 4 e não se observou associação entre o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* e a PDAH, para ambas as estratégias utilizadas (HRR - $\chi^2=0,000$; $df=1$; $p=1,000$; TDT - $\chi^2=0,091$; $df=1$; $p=0,763$). Não existem estudos efetuados a nível mundial com trios, no entanto um estudo caso-controlo com 143 indivíduos caucasianos adultos (Conner et al., 2008) e uma meta-análise (Sánchez-Mora et al., 2010) também não revelaram associação entre o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* e a PDAH, para o subtipo inatento.

Tabela 4 - Polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* na amostra de trios relativa ao subtipo inatento: estratégias HRR e TDT

Subtipo inatento	<i>HRR</i>			<i>TDT</i>		
	T	NT	Total	T	NT	Total
Alelo Met66	8	7	15	6	5	11
Alelo Val66	38	39	77	5	6	11
Total	46	46	92	11	11	22
	$\chi^2=0,000$; $df=1$; $p=1,000$			$\chi^2=0,091$; $df=1$; $p=0,763$		

Para o subtipo misto os resultados obtidos estão representados na Tabela 5 e as estratégias HRR ($\chi^2= 3,282$; $df=1$; $p=0,070$) e TDT ($\chi^2= 3,596$; $df=1$; $p=0,058$) revelaram uma tendência de associação entre o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* e a PDAH.

Tabela 5 - Polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* na amostra de trios relativa ao subtipo misto: estratégias HRR e TDT

Subtipo misto	<i>HRR</i>			<i>TDT</i>		
	T	NT	Total	T	NT	Total
Alelo Met66	34	21	55	30	17	47
Alelo Val66	102	115	217	17	30	47
Total	136	136	272	47	47	94
	$\chi^2= 3,282$; $df=1$; $p=0,070$			$\chi^2= 3,596$; $df=1$; $p=0,058$		

No sentido de se esclarecer os resultados obtidos pelo HRR e TDT relativamente ao subtipo misto é importante a realização de um estudo com uma amostra de trios maior da população portuguesa. De referir que a meta-análise caso-controlo realizada por Sánchez-Mora e colaboradores (2010) não revelou associação entre o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* e a PDAH numa amostra de 1445 indivíduos de quatro populações europeias.

Relativamente ao subtipo inatento, optou-se por não se realizar a análise de género face ao número reduzido de trios do sexo feminino. Para o subtipo misto, procedeu-se também à estratificação da amostra para a análise de género, e os resultados obtidos quer para o sexo masculino quer para o sexo feminino, utilizando a estratégia do HRR e TDT, estão representados nas Tabelas 6 e 7. No que se refere ao sexo masculino do subtipo misto, os resultados são negativos para o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* (HRR: $\chi^2=1,399$; $df=1$; $p=0,237$; TDT: $\chi^2=0,947$; $df=1$; $p=0,331$).

Tabela 6 - Polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* na amostra de trios relativa ao sexo masculino do subtipo misto: estratégias HRR e TDT

Subtipo misto sexo masculino	<i>HRR</i>			<i>TDT</i>		
	T	NT	Total	T	NT	Total
Alelo Met66	26	18	44	22	16	38
Alelo Val66	82	90	172	16	22	38
Total	108	108	216	38	38	76
$\chi^2=1,399$; df=1; p=0,237			$\chi^2=0,947$; df=1; p=0,331			

Para o sexo feminino do subtipo misto, os resultados obtidos para o HRR são negativos ($\chi^2=1,810$; df=1; p=0,178). Para a estratégia do TDT observou-se um valor de p=0,020 que pode ser um falso-positivo, tendo em conta o número reduzido de trios informativos incluídos na análise do sexo feminino.

Tabela 7 - Polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* na amostra de trios relativa ao sexo feminino do subtipo misto: estratégias HRR e TDT

Subtipo misto sexo feminino	<i>HRR</i>			<i>TDT</i>		
	T	NT	Total	T	NT	Total
Alelo Met66	8	3	11	8	1	9
Alelo Val66	20	25	45	1	8	9
Total	28	28	56	9	9	18
$\chi^2=1,810$; df=1; p=0,178			$\chi^2= 5,440$; df=1; p=0,020			

Apesar de não existirem estudos a nível mundial da análise de género nos subtipos de PDAH é importante a realização dos mesmos, uma vez que existem diferenças entre género na PDAH e podem existir genes de suscetibilidade diferentes para o sexo feminino e masculino.

3.2. Estudo de associação entre o polimorfismo do gene $p75^{NTR}$ e a PDAH

3.2.1. Polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ e a PDAH

O gene que codifica o recetor $p75^{NTR}$ é importante para a etiologia da PDAH, uma vez que o recetor $p75^{NTR}$ interage com as proneurotrofinas e neurotrofinas, desencadeando vários mecanismos de sinalização celular, particularmente a sobrevivência neuronal. Assim, neste trabalho propôs-se o estudo do gene candidato $p75^{NTR}$ (Figura 14) na etiologia da PDAH na população portuguesa.

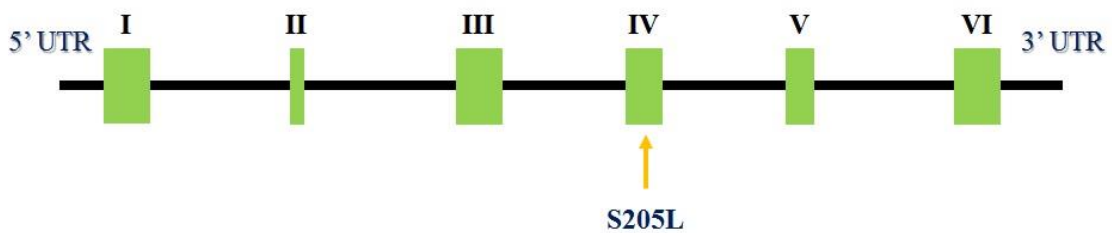


Figura 14: Esquema da estrutura do gene $p75^{NTR}$. Os exões estão numerados de I a VI; o polimorfismo S205L localiza-se no exão IV do gene $p75^{NTR}$.

Para a realização da genotipagem, procedeu-se à amplificação de um fragmento de DNA com 386 pb, contendo o polimorfismo S205L, que consiste na alteração de um nucleótido de Citosina por uma Timina na posição 727 do gene $p75^{NTR}$, segundo o protocolo descrito no ponto 2.4.2.2.1. de Material e Métodos. O produto de amplificação está representado no gel de agarose da Figura 15.

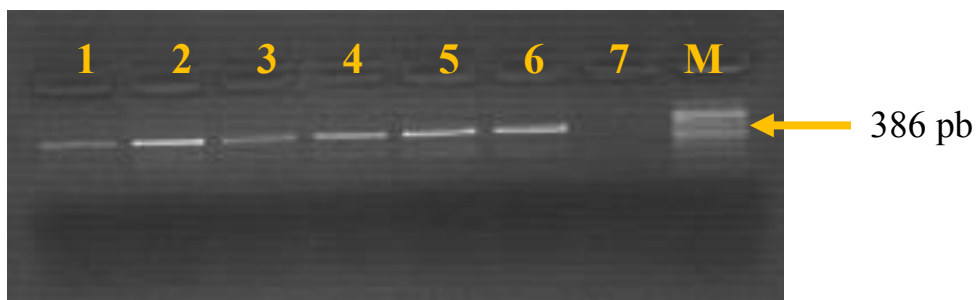


Figura 15: Eletroforese em gel de agarose a 2% para testar a amplificação do fragmento de 386 pb do gene $p75^{NTR}$. Legenda: 1 a 6 – fragmento de DNA amplificado; 7 - controlo negativo; M - marcador de peso molecular de 100 pb (Gene Ruler 100 pb DNA Ladder, Thermo Scientific).

Após a amplificação do DNA, este foi digerido com a enzima de restrição BanII e obtiveram-se fragmentos de DNA com 289 pb e 97 pb, 386 pb, 289 pb e 97 pb e 386 pb que correspondem a indivíduos homocigóticos S205/S205, heterocigóticos S205/L205 e homocigóticos L205/L205, respectivamente (Figura 16).



Figura 16: Perfil eletroforético do polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ em gel de agarose a 3%. Legenda: 1,3,6,7,8,9,12,13,14,15 e 17 - indivíduos homocigóticos para o alelo S205 (S205/S205); 2,4,5,16 e 19 - indivíduos heterocigóticos (S205/L205); 11 e 18 - indivíduos homocigóticos para o alelo L205 (L205/L205); 10 - amostra não amplificada; M - marcador de peso molecular de 100 pb (Gene Ruler 100 pb DNA Ladder, Thermo Scientific).

3.2.2. Amostra total de trios: Polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ e PDAH

À semelhança do gene *BDNF*, efetuaram-se as análises estatísticas através das estratégias HRR e TDT na amostra total de trios e os resultados obtidos representados na Tabela 8 não revelaram associação entre o polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ e a PDAH (HRR - $\chi^2=0,113$; $df=1$; $p=0,737$; TDT - $\chi^2=0,121$; $df=1$; $p=0,728$).

Tabela 8 - Polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ na amostra de trios total: estratégias HRR e TDT

Amostra total	<i>HRR</i>			<i>TDT</i>		
	T	NT	Total	T	NT	Total
Alelo L205	18	21	39	15	18	33
Alelo S205	198	195	393	18	15	33
Total	216	216	432	33	33	66
	$\chi^2=0,113$; $df=1$; $p=0,737$			$\chi^2=0,121$; $df=1$; $p=0,728$		

À luz do nosso conhecimento, não existem estudos com base em trios realizados entre o polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ e a PDAH a nível mundial, excetuando o estudo caso-controlo com 143 indivíduos adultos do sexo masculino, que também não revelou associação entre o polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ e a PDAH (Conner et al., 2008). Apesar dos nossos resultados não revelarem associação entre o polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ e a PDAH, é importante realizar outros estudos de associação do tipo caso-controlo e com base em trios, em diferentes populações mundiais. De facto, é necessário efetuar estudos do polimorfismo S205L, uma vez que o recetor $p75^{NTR}$ está associado a vias de sinalização celulares de regiões cerebrais implicadas na fisiopatologia da PDAH, apesar de, até ao momento, ainda não estar totalmente esclarecido o mecanismo associado às alterações induzidas pelo polimorfismo S205L no recetor $p75^{NTR}$. Além disso, uma vez que o polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ leva à alteração de uma serina por uma leucina na estrutura do recetor $p75^{NTR}$, esta pode interferir na dimerização e interação do recetor com as neurotrofinas. É importante ainda referir que o recetor $p75^{NTR}$ é expresso em regiões cerebrais, como por exemplo no córtex pré-frontal, no cerebelo e no putamen caudado, que têm sido implicadas na PDAH e alterações genéticas no gene que codifica o recetor $p75^{NTR}$ podem conduzir a alterações na função do mesmo, podendo induzir disfunções nas regiões cerebrais referidas.

3.2.3. Análise de género: Polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ e PDAH

Na PDAH existem diferenças ao nível de género, como referido anteriormente, sendo a patologia mais prevalente no sexo masculino do que no sexo feminino. Assim, com o objetivo de se avaliar se existem diferenças entre o sexo feminino e o sexo masculino na população portuguesa, efetuou-se à semelhança do gene *BDNF*, a análise de género, estratificando a amostra total de trios e os resultados obtidos das estratégias do HRR e do TDT estão representados nas Tabelas 9 e 10.

Relativamente ao sexo feminino não se obteve associação entre o polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ e a PDAH, quer pelo HRR ($\chi^2=0,137$; $df=1$; $p=0,711$), quer pelo TDT ($\chi^2=0,500$; $df=1$; $p=0,480$).

Tabela 9 - Polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ na amostra de trios relativa ao sexo feminino: estratégias HRR e TDT.

Amostra total sexo feminino	HRR			TDT		
	T	NT	Total	T	NT	Total
Alelo L205	3	5	8	3	5	8
Alelo S205	43	41	84	5	3	8
Total	46	46	92	8	8	16
$\chi^2=0,137$; df=1; p=0,711			$\chi^2=0,500$; df=1; p= 0,480			

Para o sexo masculino, os resultados estão presentes na Tabela 10 e à semelhança do sexo feminino, não revelaram diferenças estatisticamente significativas entre os alelos transmitidos (T) e não transmitidos (NT) em ambas as estratégias utilizadas (HRR - $\chi^2=0,000$; df=1; p=1,000; TDT - $\chi^2=0,040$; df=1; p= 0,841).

Tabela 10 - Polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ na amostra de trios relativa ao sexo masculino: estratégias HRR e TDT

Amostra total sexo masculino	HRR			TDT		
	T	NT	Total	T	NT	Total
Alelo L205	15	16	31	12	13	25
Alelo S205	155	154	309	13	12	25
Total	170	170	340	25	25	50
$\chi^2=0,000$; df=1; p=1,000			$\chi^2=0,040$; df=1; p= 0,841			

A nível mundial não existem estudos de análise de género utilizando trios para o polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ na PDAH e um estudo caso-controlo com 143 indivíduos adultos do sexo masculino não revelou associação entre o polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ e a PDAH (Conner et al., 2008). Uma vez que não existem estudos a nível mundial é importante a realização de análise de género, em populações mundiais diferentes, face às diferenças entre género na PDAH que podem ter repercussões na diferença de genes de suscetibilidade para o sexo feminino e masculino.

3.2.4. Análise de subtipo: Polimorfismo S205L do gene p75^{NTR} e PDAH

Como realizado na análise de género, efetuou-se também uma estratificação por subtipo de PDAH da amostra total de trios para se avaliar diferenças entre subtipos da patologia na população portuguesa. No entanto, tal como no gene *BDNF*, apenas se realizou a análise estatística para os subtipos inatento e misto da PDAH, devido ao reduzido número de trios para o subtipo hiperativo-impulsivo. Assim, relativamente ao subtipo inatento, os resultados apresentados na Tabela 11, para ambas as estratégias, não demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre os alelos transmitidos (T) e os não transmitidos (NT) (HRR - $\chi^2=0,136$; $df=1$; $p=0,712$; TDT - $\chi^2=0,500$; $df=1$; $p=0,480$). Não existem estudos com base em trios a nível mundial e não foi observada associação entre o polimorfismo S205L do gene p75^{NTR} no subtipo inatento da PDAH, num estudo caso-controlo efetuado por Conner e colaboradores (2008).

Tabela 11 - Polimorfismo S205L do gene p75^{NTR} na amostra de trios relativa ao subtipo inatento: estratégias HRR e TDT

Subtipo Inatento	<i>HRR</i>			<i>TDT</i>		
	T	NT	Total	T	NT	Total
Alelo L205	3	5	8	3	5	8
Alelo S205	45	43	88	5	3	8
Total	48	48	96	8	8	16
	$\chi^2=0,136$; $df=1$; $p=0,712$			$\chi^2=0,500$; $df=1$; $p=0,480$		

Em relação ao subtipo misto, os resultados obtidos estão presentes na Tabela 12 e à semelhança do subtipo inatento, a estratégia do HRR e do TDT não demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre os alelos transmitidos (T) e os alelos não transmitidos (NT) para o polimorfismo S205L do gene p75^{NTR} (HRR - $\chi^2=0,008$; $df=1$; $p=0,930$; TDT - $\chi^2=0,000$; $df=1$; $p=1,000$).

Tabela 12 - Polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ na amostra de trios relativa ao subtipo misto: estratégias HRR e TDT

Subtipo Misto	HRR			TDT		
	T	NT	Total	T	NT	Total
Alelo L205	14	15	29	12	12	24
Alelo S205	150	149	299	12	12	24
Total	164	164	328	24	24	48
$\chi^2=0,008$; $df=1$; $p=0,930$			$\chi^2=0,000$; $df=1$; $p=1,000$			

No nosso trabalho, os resultados obtidos para os subtipos de PDAH estudados não revelaram associação entre o polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ e PDAH. Até ao momento não se conhecem estudos de associação entre o polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ e o subtipo misto da PDAH, em outras populações mundiais, pelo que é importante o desenvolvimento de estudos com base em trios e caso-controlo em populações mundiais diferentes para se avaliarem possíveis diferenças entre subtipos de PDAH.

Em relação ao subtipo inatento a análise de género não foi realizada, tendo em conta o número reduzido de trios do sexo feminino. De forma semelhante ao realizado para o gene *BDNF*, foi efetuada uma análise de género para o subtipo misto. Para o sexo feminino do subtipo misto, os resultados estão presentes na Tabela 13 e não se observou associação entre o polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ e a PDAH, quer no HRR ($\chi^2=0,000$; $df=1$; $p=1,000$), quer no TDT ($\chi^2=0,200$; $df=1$; $p=0,655$).

Tabela 13 - Polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ na amostra de trios relativa ao sexo feminino do subtipo misto: estratégias HRR e TDT

Subtipo misto sexo feminino	HRR			TDT		
	T	NT	Total	T	NT	Total
Alelo L205	2	3	5	2	3	5
Alelo S205	30	29	59	3	2	5
Total	32	32	64	5	5	10
$\chi^2=0,000$; $df=1$; $p=1,000$			$\chi^2=0,200$; $df=1$; $p=0,655$			

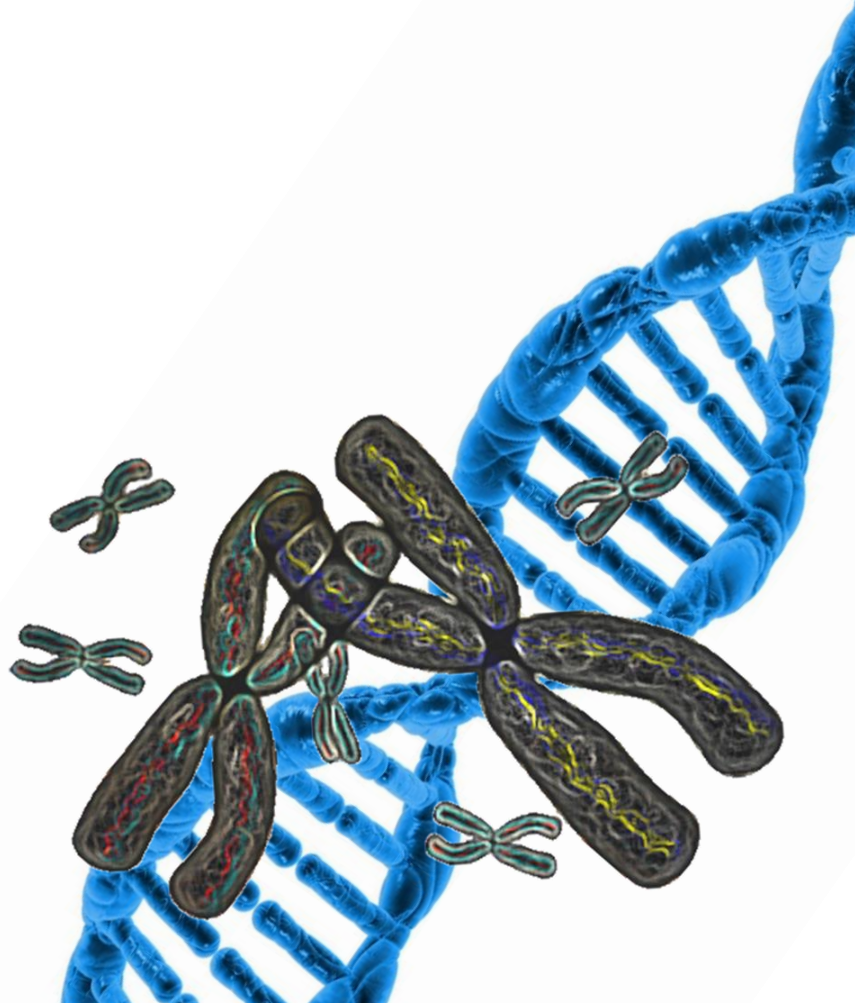
Relativamente ao sexo masculino do subtipo misto, os resultados encontram-se na tabela 14 e foram semelhantes aos do sexo feminino, não se tendo observado associação entre o polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ e a patologia, em ambas as estratégias utilizadas (HRR - $\chi^2=0,046$; $df=1$; $p=0,830$; TDT - $\chi^2=0,05$; $df=1$; $p=0,823$).

Tabela 14 - Polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ na amostra de trios relativa ao sexo masculino do subtipo misto: estratégias HRR e TDT

Subtipo misto sexo masculino	<i>HRR</i>			<i>TDT</i>		
	T	NT	Total	T	NT	Total
Alelo L205	12	12	24	10	9	19
Alelo S205	120	120	240	9	10	19
Total	132	132	264	19	19	38
	$\chi^2=0,046$; $df=1$; $p=0,830$			$\chi^2=0,050$; $df=1$; $p=0,823$		

A nível mundial, que tenhamos conhecimento, não existem estudos de análise de género para os subtipos da PDAH referentes ao gene $p75^{NTR}$. Assim, é importante o desenvolvimento de estudos com base em trios e a análise de género para os subtipos de PDAH, uma vez que à semelhança de outros genes estudados existem diferenças a nível genético.

Conclusão

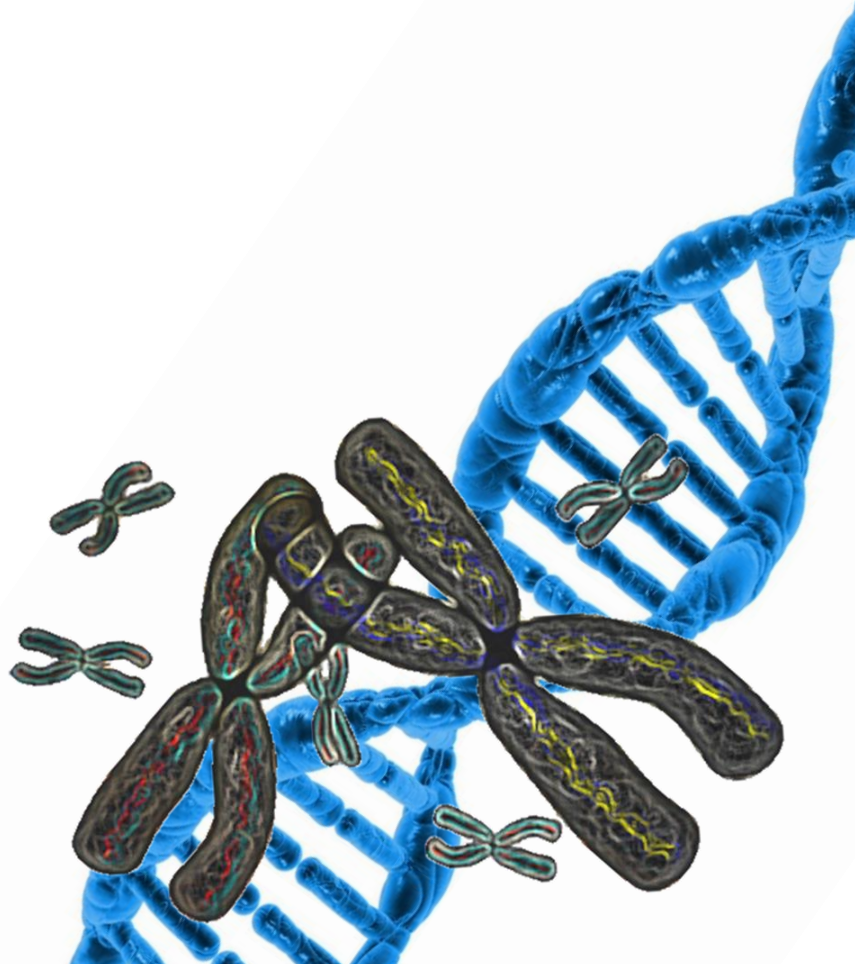


4. Conclusão

Neste trabalho foi realizado um estudo de associação com base em trios, utilizando as estratégias HRR e TDT. Na amostra total de trios, na análise de gênero e no subtipo inatento não se observou associação entre o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* e a PDAH, através das estratégias HRR e TDT, sugerindo que o gene *BDNF* não apresenta um papel direto na etiologia da PDAH. Relativamente ao subtipo misto verificou-se uma tendência de associação entre o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* e a PDAH, em ambas as estratégias utilizadas, pelo que é importante o desenvolvimento de estudos adicionais para se esclarecer o resultado obtido. Na estratificação de gênero do subtipo misto não se verificou associação entre o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* e a PDAH, para o sexo masculino. Em relação ao sexo feminino o resultado obtido, face ao número de trios informativos analisados, carece de estudos adicionais uma vez que o resultado pode ser um falso-positivo.

Para o gene *p75^{NTR}* utilizando as estratégias HRR e TDT não se observou associação entre o polimorfismo S205L e a PDAH, na amostra total de trios, na análise de gênero, no subtipo misto, no subtipo inatento, no sexo feminino/masculino do subtipo misto. Assim, estes resultados parecem sugerir que o gene *p75^{NTR}* não desempenha um papel importante na etiologia da PDAH.

Perspetivas Futuras



5. Perspetivas Futuras

Face aos resultados obtidos neste estudo e ao papel que as neurotrofinas e seus recetores desempenham a nível neuronal, é importante o estudo de outros polimorfismos e genes do sistema neurotrófico, particularmente do recetor TrkB. O BDNF liga com alta afinidade a este recetor desencadeando importantes vias de sinalização celular que induzem a plasticidade sináptica e o crescimento e sobrevivência neuronal (Figura 18) (Autry e Monteggia, 2012).

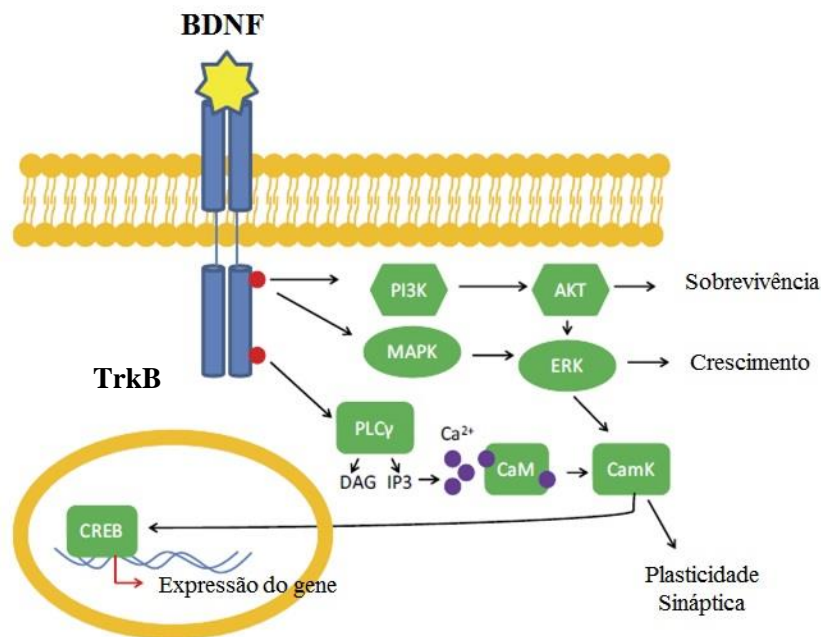


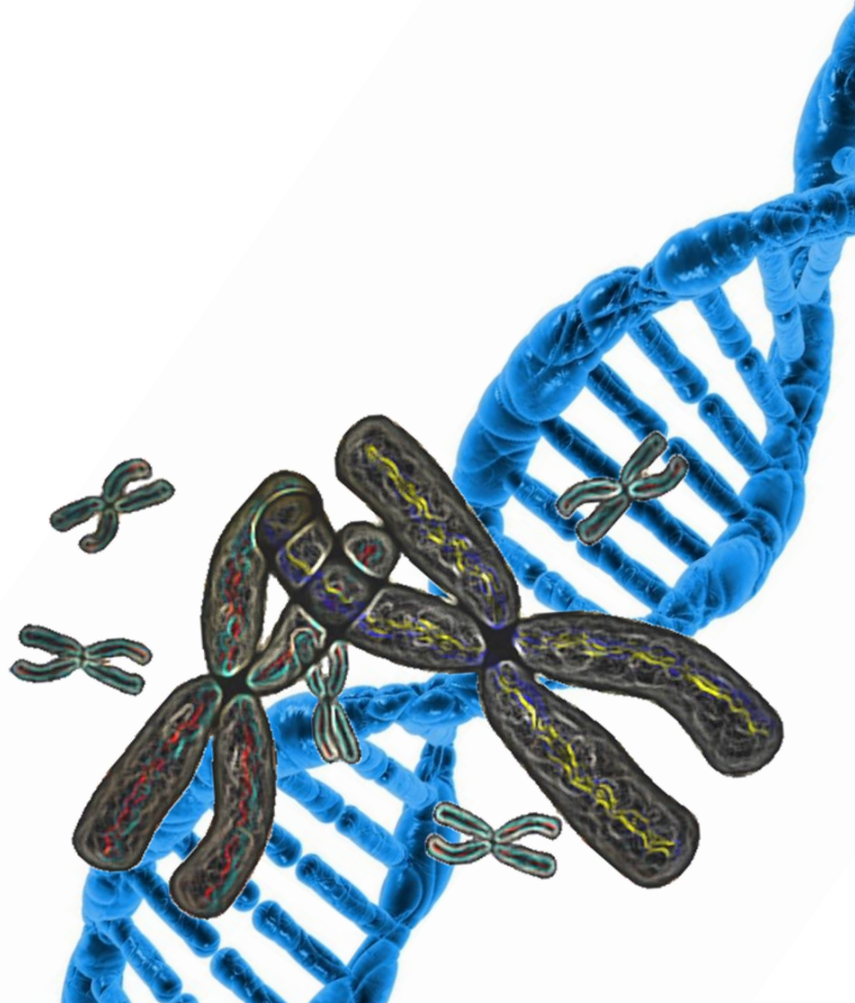
Figura 17: Vias de sinalização decorrentes da interação do BDNF com o recetor TrkB (adaptado de Autry e Monteggia, 2012).

Para além disso, o BDNF apresenta ainda uma atividade modeladora do sistema dopaminérgico através da ativação do TrkB (Blochl et al., 1996). Assim seria importante o estudo da interação entre o gene *BDNF* e o gene *TrkB*, bem como a interação destes genes com genes do sistema dopaminérgico, por exemplo o gene *DAT1*.

Relativamente ao polimorfismo S205L do gene *p75^{NTR}*, seria importante o desenvolvimento de estudos funcionais para compreender e esclarecer o papel deste polimorfismo na atividade do recetor *p75^{NTR}*.

Salienta-se ainda a importância de realizar estudos de farmacogenética no sentido de se proporcionar terapias mais individualizadas aos doentes com PDAH o que permitirá uma melhor qualidade de vida e bem-estar dos indivíduos com a patologia.

Referências



6. Referências

- Aarnoudse-Moens, C.S.; Weisglas-Kuperus, N.; van Goudoever, J.B.; Oosterlaan, J. (2009). Meta-analysis of neurobehavioral outcomes in very preterm and/or very low birth weight children. Pediatrics 124(2): 717-728.
- Almeida, R.D.; Duarte, C.B. (2014). p75NTR Processing and Signaling: Functional Role. In Handbook of Neurotoxicity, New York, pp.1899-1923.
- American Psychiatric Association (2013). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition. American Psychiatric Association, Washington, DC.
- Amiri, A.; Torabi Parizi, G.; Kousha, M.; Saadat, F.; Modabbernia, M.J.; Najafi, K.; Atrkar Roushan Z. (2013). Changes in plasma brain-derived neurotrophin factor (BDNF) levels induced by methylphenidate in children with Attention deficit-hyperactivity disorder (ADHD). Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatr 47:20-24.
- Amiri, S.; Malek, A.; Sadegfard, M.; Abdi, S. (2012). Pregnancy-related maternal risk factors of attention-deficit hyperactivity disorder: a case-control study. ISRN Pediatr 2012: 458064.
- Aureli, A.; Del Beato, T.; Sebastiani, P.; Marimpietri, A.; Melillo, C.V.; Sechi, E.; Di Loreto, S. (2010). Attention-deficit hyperactivity disorder and intellectual disability: a study of association with brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms. Int J Immunopathol Pharmacol 23(3): 873-880.
- Autry, A.E.; Monteggia, L.M. (2012). Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. Pharmacol Rev 64(2):238-58.
- Banaschewski, T.; Becker, K.; Scherag, S.; Franke, B.; Coghill D. (2010). Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: an overview. Eur Child Adolesc Psychiatry 19(3): 237-257.
- Banerjee, T.D.; Middleton, F.; Faraone, S.V. (2007). Environmental risk factors for attention-deficit hyperactivity disorder. Acta Paediatr 96(9): 1269-1274.

- Barde, Y.A.; Edgar, D.; Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. EMBO J 1(5): 549-553.
- Barkley, R.A.; Peters, H. (2012). The earliest reference to ADHD in the medical literature? Melchior Adam Weikard's description in 1775 of "attention deficit" (Mangel der Aufmerksamkeit, Attentio Volubilis). J Atten Disord 16(8): 623-630.
- Baroni, A.; Castellanos, F.X. (2015). Neuroanatomic and cognitive abnormalities in attention-deficit/hyperactivity disorder in the era of 'high definition' neuroimaging. Curr Opin Neurobiol 30: 1-8.
- Bartkowska, K.; Turlejski, K.; Djavadian, R.L. (2010). Neurotrophins and their receptors in early development of the mammalian nervous system. Acta Neurobiol Exp 70(4): 454-467.
- Bhutta, A.T.; Cleves, M.A.; Casey, P.H.; Craddock, M.M.; Anand, K.J. (2002). Cognitive and behavioral outcomes of school-aged children who were born preterm: a meta-analysis. JAMA 288(6): 728-737.
- Binder, D.K.; Scharfman, H.E. (2004). Brain-derived neurotrophic factor. Growth Factors 22(3): 123-131.
- Bloch, A.; Sirrenberg, C. (1996). Neurotrophins stimulate the release of dopamine from rat mesencephalic neurons via Trk and p75L_{nt}r receptors. J Biol Chem 271(35): 21100-21107.
- Boulle, F.; van den Hove, D.L.; Jakob, S.B.; Rutten, B.P.; Hamon, M.; van Os, J.; Lesch, K.P.; Lanfumey, L.; Steinbusch, H.W.; Kenis, G. (2012). Epigenetic regulation of the BDNF gene: implications for psychiatric disorders. Mol Psychiatr 17(6): 584-596.
- Burmeister, M. (1999). Complex Genetics and Implications for Psychiatry - Basic Concepts in the Study of Diseases with Complex Genetics. Biol Psychiatry 45: 522-532.
- Chao, M.V.; Rajagopal, R.; Lee, F.S. (2006). Neurotrophin signalling in health and disease. Clin Sci 110(2): 167-173.

- Chao, M.V. (2003). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. Nat Rev Neurosci 4(4): 299-309.
- Chen, Z.Y.; Patel, P.D.; Sant, G.; Meng, C.X.; Teng, K.K.; Hempstead, B.L.; Lee, F.S. (2004). Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons. J Neurosci 24(18): 4401-4411.
- Cho, S.C; Kim, H.W.; Kim, B.N.; Kim, J.W.; Shin, M.S.; Chung, S.; Cho, D.Y.; Jung, S.W.; Yoo, H.J.; Chung, I.W.; Chung, U.S; Son, J.W. (2010). Gender-Specific Association of the Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. Psychiatr Investig 7(4): 285–290.
- Collins, F.S.; Green, E.D.; Guttmacher, A.E.; Guyer, M.S. (2003). A vision for the future of genomics research - A blueprint for the genomic era. Nature 422(6934): 835-847.
- Conner, A.C.; Kissling, C.; Hodges, E.; Hünnerkopf, R.; Clement, R.M.; Dudley, E.; Freitag, C.M.; Rösler, M.; Retz, W.; Thome J. (2008). Neurotrophic factor-related gene polymorphisms and adult attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) score in a high-risk male population. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 147B(8): 1476-1480.
- Curatolo, P.; D'Agati, E.; Moavero, R. (2010). The neurobiological basis of ADHD. Ital J Pediatr 36(1):79.
- Dincheva, I.; Glatt, C.E.; Lee, F.S. (2012). Impact of the BDNF Val66Met polymorphism on cognition: implications for behavioral genetics. Neuroscientist 18(5): 439-451.
- Egan, M.F.; Kojima, M.; Callicott, J.H.; Goldberg, T.E.; Kolachana, B.S.; Bertolino, A.; Zaitsev, E.; Gold, B.; Goldman, D.; Dean, M.; Lu, B.; Weinberger, D.R. (2003). The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. Cell 112(2): 257-269.
- Falk, C.T.; Rubinstein, P. (1987). Haplotype relative risks: an easy reliable way to construct a proper control sample for risk calculations. Ann Hum Genet 51(3): 227-233.

- Faraone, S.V.; Perlis, R.H.; Doyle, A.E.; Smoller, J.W.; Goralnick, J.J.; Holmgren, M.A.; Sklar, P. (2005). Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. Biol Psychiatr 57(11): 1313-1323.
- Faraone, S.V.; Sergeant, J.; Gillberg, C.; Biederman, J. (2003). The worldwide prevalence of ADHD: is it an American condition? World Psychiatr 2(2): 104-113.
- Fayyad, J.; De Graaf, R.; Kessler, R.; Alonso, J.; Angermeyer, M.; Demyttenaere, K.; De Girolamo, G.; Haro, J.M.; Karam, E.G.; Lara, C.; Lepine, J.P.; Ormel, J.; Posada-Villa, J.; Zaslavsky, A.M.; Jin, R. (2007). Cross-national prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder. Br J Psychiatr 190: 402-409.
- Franke, B.; Faraone, S.V.; Asherson, P.; Buitelaar, J.; Bau, C.H.; Ramos-Quiroga, J.A.; Mick, E.; Grevet, E.H.; Johansson, S.; Haavik, J.; Lesch, K.P.; Cormand, B.; Reif, A. (2012). The genetics of attention deficit/hyperactivity disorder in adults, a review. Mol Psychiatr 17(10): 960-987.
- Franke, B.; Neale, B.M.; Faraone, S.V. (2009). Genome-wide association studies in ADHD. Hum Genet 126(1): 13-50.
- Frazer, K.A.; Murray, S.S.; Schork, N.J.; Topol, E.J. (2009). Human genetic variation and its contribution to complex traits. Nat Rev Genet 10(4): 241-251.
- Friedel, S.; Horro, F.F.; Wermter, A.K.; Geller, F.; Dempfle, A.; Reichwald, K.; Smidt, J.; Brönnner, G.; Konrad, K.; Herpertz-Dahlmann, B.; Warnke, A.; Hemminger, U.; Linder, M.; Kiefl, H.; Goldschmidt, H.P.; Siegfried, W.; Remschmidt, H.; Hinney, A.; Hebebrand, J. (2005). Mutation screen of the brain derived neurotrophic factor gene (BDNF): identification of several genetic variants and association studies in patients with obesity, eating disorders, and attention-deficit/hyperactivity disorder. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 132B(1): 96-99.
- Fujii, T.; Kunugi, H. (2009). p75NTR as a therapeutic target for neuropsychiatric diseases. Curr Mol Pharmacol 2(1): 70-76.
- Garibyan, L.; Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. J Invest Dermatol 133(3):

- Han, J.Y.; Kwon, H.J.; Ha, M.; Paik, K.C.; Lim, M.H.; Gyu Lee, S.; Yoo, S.J.; Kim, E.J. (2015). The effects of prenatal exposure to alcohol and environmental tobacco smoke on risk for ADHD: a large population-based study. Psychiatry Res 225(1-2): 164-168.
- Hawi, Z.; Cummins, T.D.; Tong, J.; Johnson, B.; Lau, R.; Samarrai, W.; Bellgrove, M.A. (2015). The molecular genetic architecture of attention deficit hyperactivity disorder. Mol Psychiatr 20(3): 289-297.
- Huang, E.J.; Reichardt, L.F. (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. Annu Rev Neurosci 24: 677-736.
- Huebner, K.; Isobe, M.; Chao, M.; Bothwell, M.; Ross, A.H.; Finan, J.; Hoxie, J.A.; Sehgal, A.; Buck, C.R.; Lanahan, A.; Nowell, P.C.; Koprowski, H.; Croce, C.M. (1986). The nerve growth factor receptor gene is at human chromosome region 17q12-17q22, distal to the chromosome 17 breakpoint in acute leukemias. Proc Natl Acad Sci USA 83(5):1403-1407.
- Huizink, A.C.; Mulder, E.J. (2006). Maternal smoking, drinking or cannabis use during pregnancy and neurobehavioral and cognitive functioning in human offspring. Neurosci Biobehav Rev 30(1): 24-41.
- Hyman, C.; Hofer, M.; Barde, Y.A.; Juhasz, M.; Yancopoulos, G.D.; Squinto, S.P.; Lindsay, R.M. (1991). BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. Nature 350(6315): 230-232.
- Kaplan, D.R.; Miller, F.D. (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. Curr Opin Neurobiol 10(3): 381-391.
- Kent, L.; Green, E.; Hawi, Z.; Kirley, A.; Dudbridge, F.; Lowe, N.; Raybould, R.; Langley, K.; Bray, N.; Fitzgerald, M.; Owen, M.J.; O'Donovan, M.C.; Gill, M.; Thapar, A.; Craddock, N. (2005). Association of the paternally transmitted copy of common Valine allele of the Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene with susceptibility to ADHD. Mol Psychiatr 10(10): 939-943.

- Knüsel, B., Winslow, J.W., Rosenthal, A., Burton, L.E., Seid, D.P., Nikolics, K., and Hefti, F. (1991). Promotion of central cholinergic and dopaminergic neuron differentiation by brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin 3. Proc Natl Acad Sci USA 88(3): 961–965.
- Kunugi, H.; Hashimoto, R.; Yoshida, M.; Tatsumi, M.; Kamijima, K. (2004). A Missense Polymorphism (S205L) of the Low-Affinity Neurotrophin Receptor p75NTR Gene Is Associated With Depressive Disorder and Attempted Suicide. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 129B(1): 44-46.
- Lange, K.W.; Reichl, S.; Lange, K.M.; Tucha, L.; Tucha, O. (2010). The history of attention deficit hyperactivity disorder. Atten Defic Hyperact Disord 2(4): 241–255.
- Lanktree, M.; Squassina, A.; Krinsky, M.; Strauss, J.; Jain, U.; Macciardi, F.; Kennedy, J.L.; Muglia, P. (2008). Association study of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and LIN-7 homolog (LIN-7) genes with adult attention-deficit/hyperactivity disorder. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 147B(6): 945-951.
- Lebel, C.; Roussotte, F.; Sowell, E.R. (2011). Imaging the impact of prenatal alcohol exposure on the structure of the developing human brain. Neuropsychol Rev 21(2): 102-118.
- Lee, J.; Laurin, N.; Crosbie, J.; Ickowicz, A.; Pathare, T.; Malone, M.; Tannock, R.; Kennedy, J.L.; Schachar, R.; Barr, C.L. (2007). Association study of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene in attention deficit hyperactivity disorder. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 144B(8): 976-981.
- Lee, Y.H.; Song, G.G. (2015). BDNF 196 G/A and COMT Val158Met Polymorphisms and Susceptibility to ADHD: A Meta-Analysis. J Atten Disord 1-6.
- Li, H; Liu, L.; Tang, Y.; Ji, N.; Yang, L.; Qian, Q.; Wang, Y. (2014b). Sex-specific association of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met polymorphism and plasma BDNF with attention-deficit/hyperactivity disorder in a drug-naïve Han Chinese sample. Psychiatr Res 217(3):191-197

- Li, Z.; Chang, S.H.; Zhang, L.Y.; Gao, L.; Wang, J. (2014a). Molecular genetic studies of ADHD and its candidate genes: a review. Psychiatr Res 219(1): 10-24.
- Liu, D.Y.; Shen, X.M.; Yuan, F.F.; Guo, O.Y.; Zhong, Y.; Chen, J.G.; Zhu, L.Q.; Wu, J. (2014). The Physiology of BDNF and Its Relationship with ADHD. Mol Neurobiol [Epub].
- Lu, B.; Pang, P.T.; Woo, N.H. The yin and yang of neurotrophin action. Nat Rev Neurosci 6(8): 603-614.
- Meredith, G.E.; Callen, S.; Scheuer, D.A. (2002). Brain-derived neurotrophic factor expression is increased in the rat amygdala, piriform cortex and hypothalamus following repeated amphetamine administration. Brain Res 949(1-2): 218-227.
- Mick, E.; Faraone, S.V. (2008). Genetics of attention deficit hyperactivity disorder. Child Adolesc Psychiatr Clin N Am 17(2): 261-284.
- Milberger, S.; Biederman, J.; Faraone S.V.; Jones, J. (1998). Further evidence of an association between maternal smoking during pregnancy and attention deficit hyperactivity disorder: findings from a high-risk sample of siblings. J Clin Child Psychol 27(3): 352-358.
- Milberger, S.; Biederman, J.; Faraone, S.V.; Chen, L.; Jones, J. (1996). Is maternal smoking during pregnancy a risk factor for attention deficit hyperactivity disorder in children? Am J Psychiatr 153(9): 1138-1142.
- Miller, S.A.; Dykes, D.D.; Polesky, H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 16(3): 1215.
- Millichap, J.G. (2008). Etiologic classification of attention-deficit/hyperactivity disorder. Pediatrics 121(2): 358-365.
- Mullis, K.B. (1990). The unusual origin polymerase chain reaction. Sci Am 262(4): 56-61 e 64-65.
- Nakamura, Y. (2009). DNA variations in human and medical genetics: 25 years of my experience. J Hum Genet 54(1): 1-8.

- Neves-Pereira, M.; Mundo, E.; Muglia, P.; King, N.; Macciardi, F.; Kennedy, J.L. (2002). The Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene Confers Susceptibility to Bipolar Disorder: Evidence from a Family-Based Association Study. Am J Hum Genet 71: 651–655.
- Nicklas, J.A.; Buel, E. (2003). Quantification of DNA in forensic samples. Anal Bioanal Chem 376(8): 1160-1167
- Ott, J.; Kamatani, Y.; Lathrop, M. (2011). Family-based designs for genome-wide association studies. Nat Rev Genet 12(7): 465-474.
- Patapoutian, A.; Reichardt, L.F. (2001). Trk receptors: mediators of neurotrophin action. Curr Opin Neurobiol 11(3): 272-280.
- Poelmans, G.; Pauls, D.L.; Buitelaar, J.K.; Franke, B. (2011). Integrated genome-wide association study findings: identification of a neurodevelopmental network for attention deficit hyperactivity disorder. Am J Psychiatry 168(4): 365-377.
- Pruunsild P.; Kazantseva, A.; Aid, T.; Palm, K.; Timmusk, T. (2007). Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. Genomics 90(3): 397-406.
- Reichardt, L. F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 361(1473): 1545-1564.
- Sahebi, L.; Dastgiri, S.; Ansarin, K.; Sahebi, R.; Mohammadi, S.A. (2013). Study Designs in Genetic Epidemiology. ISRN Genetics 2013: 1-8.
- Sambrook, J.; Russell, D.W. (2001). Molecular Cloning – A Laboratory Manual, Third Edition. Cold Spring Harbor Laborat Press, New York
- Sánchez-Mora, C.; Ribasés, M.; Ramos-Quiroga, J.A.; Casas, M.; Bosch, R.; Boreatti-Hümmer, A.; Heine, M.; Jacob, C.P.; Lesch, K.P.; Fasmer, O.B.; Knappskog, P.M.; Kooij, J.J.; Kan, C.; Buitelaar, J.K.; Mick, E.; Asherson, P.; Faraone, S.V.; Franke, B.; Johansson, S.; Haavik, J.; Reif, A.; Bayés, M.; Cormand, B. (2010). Meta-analysis of brain-derived neurotrophic factor p.Val66Met in adult ADHD in four

European populations. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 153B(2): 512-523.

Sawicki, M.P.; Samara, G.; Hurwitz, M.; Passaro, E.Jr. (1993). Human Genome Project. Am J Surg 165(2): 258-264.

Schimmelmann, B.G.; Friedel, S.; Dempfle, A.; Warnke, A.; Lesch, K.P.; Walitza, S.; Renner, T.J.; Romanos, M.; Herpertz-Dahlmann, B.; Linder, M.; Schäfer, H.; Seitz, C.; Palmason, H.; Freitag, C.; Meyer, J.; Konrad, K.; Hinney, A.; Hebebrand, J. (2007). No evidence for preferential transmission of common valine allele of the Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene (BDNF) in ADHD. J Neural Transm 114(4): 523-526.

Sehgal, A.; Patil, N.; Chao, M. (1988). A constitutive promoter directs expression of the nerve growth factor receptor gene. Mol Cell Biol 8(8): 3160–3167.

Sharp, S.I.; McQuillin, A.; Gurling, H.M. (2009). Genetics of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). Neuropharmacology 57(7-8): 590-600.

Shim, S.H.; Hwangbo, Y.; Kwon, Y.J.; Jeong, H.Y.; Lee, B.H.; Lee, H.J.; Kim, Y.K. (2008). Increased levels of plasma brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in children with attention deficit-hyperactivity disorder (ADHD). Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatr 32(8): 1824-1828.

Simon, V.; Czobor, P.; Bálint, S.; Mészáros, A.; Bitter, I. (2009). Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis. Br J Psychiatr 194(3): 204-211.

Solanto, M. V. (2002). Dopamine dysfunction in AD/HD: integrating clinical and basic neuroscience research. Behav Brain Res 130(1-2): 65-71.

Spielman, R.S.; McGinnis, R.E.; Ewens, W.J. (1993). Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). Am J Hum Genet 52(3): 506-516.

Spina, M.B.; Squinto, S.P.; Miller, J.; Lindsay, R.M.; Hyman, C. (1992). Brain-derived neurotrophic factor protects dopamine neurons against 6-hydroxydopamine and N-

methyl-4-phenylpyridinium ion toxicity: involvement of the glutathione system. J Neurochem 59(1): 99-106.

Still, G.F. (1902). The Goulstonian Lectures: On some abnormal psychological conditions in children. The Lancet 159(4104): 1163–1168.

Strachan, T; Read, A. (2011). Human Molecular Genetics, Fourth Edition. Garland Science/Taylor & Francis Group, New York

Swanson, J.M.; Sergeant, J.A.; Taylor, E.; Sonuga-Barke, E.J.; Jensen, P.S.; Cantwell, D.P. (1998). Attention-deficit hyperactivity disorder and hyperkinetic disorder. Lancet 351(9100): 429-433.

Teng, K.K.; Felice, S.; Kim, T.; Hempstead, B.L. (2010). Understanding proneurotrophin actions: Recent advances and challenges. Dev Neurobiol 70(5): 350-359.

Teng, K.K.; Hempstead, B.L. (2004). Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems. Cell Mol Life Sci 61(1):35-48.

Terwilliger, J.D.; Ott J. (1992). A haplotype-based 'haplotype relative risk' approach to detecting allelic associations. Hum Hered 42(6): 337-346.

Thapar, A.; Cooper, M.; Jefferies, R.; Stergiakouli, E. (2012). What causes attention deficit hyperactivity disorder? Arch Dis Child 97(3): 260-265.

The 1000 Genomes Project Consortium (2012). An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. Nature 91(7422): 56-65.

The 1000 Genomes Project Consortium (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. Nature 467(7319): 1061-1073.

The International HapMap 3 Consortium (2010). Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. Nature 467(7311): 52-58.

The International HapMap Consortium (2007). A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. Nature 449(7164): 851-861.

- The International HapMap Consortium (2003). The International HapMap Project. Nature 426(6968): 789-796.
- The International Human Genome Sequencing Consortium (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature 431: 931-945.
- The International Human Genome Sequencing Consortium (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409: 860-921.
- Tsai, S.J. (2007). Attention-deficit hyperactivity disorder may be associated with decreased central brain-derived neurotrophic factor activity: Clinical and therapeutic implications. Med Hypotheses 68(4): 896-899.
- Tzang, R.F.; Hsu, C.D.; Liou, Y.J.; Hong, C.J.; Tsai, S.J. (2013). Family-based association of the brain-derived neurotrophic factor gene in attention-deficit hyperactivity disorder. Psychiatr Genet 23(4):177-178.
- Watson, J.D.; Crick, F.H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. Nature 171(4356): 737-738.
- Xu, X.; Mill, J.; Zhou, K.; Brookes, K.; Chen, C.K.; Asherson, P. (2007). Family-based association study between brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms and attention deficit hyperactivity disorder in UK and Taiwanese samples. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 144B(1): 83-86.
- Zhou, K.; Dempfle, A.; Arcos-Burgos, M.; Bakker, S.C.; Banaschewski, T.; Biederman, J.; Buitelaar, J.; Castellanos, F.X.; Doyle, A.; Ebstein, R.P.; Ekholm, J.; Forabosco, P.; Franke, B.; Freitag, C.; Friedel, S.; Gill, M.; Hebebrand, J.; Hinney, A.; Jacob, C.; Lesch, K.P.; Loo, S.K.; Lopera, F.; McCracken, J.T.; McGough, J.J.; Meyer, J.; Mick, E.; Miranda, A.; Muenke, M.; Mulas, F.; Nelson, S.F.; Nguyen, T.T.; Oades, R.D.; Ogdie, M.N.; Palacio, J.D.; Pineda, D.; Reif, A.; Renner, T.J.; Roeyers, H.; Romanos, M.; Rothenberger, A.; Schafer, H.; Sergeant, J.; Sinke, R.J.; Smalley, S.L.; Sonuga-Barke, E.; Steinhausen, H.C.; van der Meulen, E.; Walitza, S.; Warnke, A.; Lewis, C.M.; Faraone, S.V.; Asherson, P. (2008). Meta-analysis of genome-wide linkage scans of attention deficit hyperactivity disorder. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 147B(8): 1392-1398.