

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**VARIABILIDADE GENÉTICA E RESPOSTA AO TRATAMENTO EM ADULTOS COM  
TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO/ HIPERATIVIDADE**

**Verônica Contini**

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

**Orientador: Prof. Dr. Claiton Henrique Dotto Bau**

Porto Alegre, setembro de 2011.

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

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

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

*"A utopia está no horizonte...  
Me aproximo dois passos, ela se distancia dois passos.  
Caminho dez passos, e o horizonte corre dez passos.  
Por mais que eu caminhe, jamais a alcançarei.  
Para que serve a utopia, então?  
Serve para isso:  
Para que eu não deixe de caminhar."*

*(Eduardo Galeano)*

## AGRADECIMENTOS

Ao longo desses anos, inúmeras pessoas contribuíram para que eu chegasse ao final desse trabalho. Cada uma, à sua maneira, faz também parte dessa tese. Talvez não consiga agradecer a todos, mas registro aqui minha gratidão às pessoas mais fundamentais.

**Ao meu orientador**, prof. Claiton Bau, por ser, primeiramente, um apaixonado pela Ciência. Há sete anos, ele tem sido a pessoa mais fundamental da minha formação profissional, e tem sido um grande exemplo. Agradeço por todos os ensinamentos práticos, por todas as discussões teóricas, pelos papos filosóficos e bate-papos divertidos. Pela dedicação incondicional, pelo apoio, amizade e, principalmente, por sempre ter confiado em mim e na minha capacidade. Ainda, agradeço pelo incentivo constante e por sempre me ouvir com atenção e paciência.

**Aos colegas e amigos da sala 109** agradeço pelo companheirismo, pelos vários momentos agradáveis e pelas gargalhadas que dividimos. Ao longo desses anos, alguns já partiram em busca de novas aventuras - Elisa, Caio e Gustavo, enquanto outros resistem bravamente - Eve, Gui e Nina. Há ainda os que chegaram mais recentemente - Leandro, Lucas e Diego. De qualquer maneira, independentemente do tempo, agradeço a todos também pela ajuda no laboratório, pela paciência e, em especial à Eve, pelas mariolas. Por fim, agradeço especialmente pelo apoio nesses últimos dias de loucura...

Ainda, agradeço **muito especialmente ao Gui** por tudo. Pela ajuda irrestrita no laboratório, mesmo nos momentos em que eu insisti em re-genotipar a MAOA em inúmeros pacientes. Pela parceria de trabalhar no Campus do Vale aos sábados, e também em alguns domingos. Pela santa paciência com as minhas manias no laboratório e com as minhas chatices de organização. Mas, além disso, agradeço principalmente pela amizade e pelo apoio fundamental na finalização dessa tese.

**A todos os colegas dos Laboratórios 114 e 116**, que dividiram não apenas o espaço físico, mas também bate-papos, dúvidas e muita diversão. Infelizmente não poderei citar o nome de todos, mas destaco com carinho a Lu Tovo e o Vinícius que, entre um almoço e outro, um vinho aqui e uma espumante ali, estão sempre dispostos a ajudar, ensinar ou simplesmente bater um papo.

**À professora Mara Hutz**, pela disponibilidade em ajudar, discutir e contribuir nos assuntos científicos. Por ter me recebido como parte da sua “família” no laboratório de Genética Humana e por sempre ter me tratado com respeito e amizade.

**À professora Sídia Callegari-Jacques**, não apenas pelo suporte em assuntos estatísticos, mas, principalmente, por ser um exemplo de professora sempre disposta a ajudar, ensinar e aprender com os alunos.

**Ao Elmo**, por estar sempre disposto a ajudar, pela dedicação e por conseguir resolver nossos problemas no PPGBM com competência e o melhor bom humor. E também, obviamente, por torcer pelo melhor time do Brasil!

**Aos colegas do PRODAH de adultos**, Eugênio Grevet, Carlos Salgado, Marcelo Victor, Felipe Picon, Rafael Karam, Eduardo Vitola, Katiane Silva, Nyvia Sousa, Paula Oliveira e Aline Fisher que, além de responsáveis pela coleta e avaliação clínica da nossa amostra, também propiciam discussões científicas e filosóficas, sempre divertidíssimas, nos encontros de sexta-feira à tarde.

Em especial, agradeço:

Ao **Mestre Vitola** por ter abraçado com o pessoal da genética a coleta do grupo controle e por toda paciência que teve em nos introduzir no mundo da psiquiatria.

Ao **Marcelo Victor**, que se tornou um amigo e grande parceiro de discussões científicas, ou não, pelos Botecos da Cidade Baixa.

Durante esses anos na Genética tive a sorte de encontrar grandes amigas no caminho. Amigas de fé, com o perdão da pieguice. Agradeço imensamente a elas, por existirem simplesmente.

Duas delas já não estão mais tão perto, **Vê Zembrzuski e Fabi Kohlrausch**, mas foram elas que me receberam de braços abertos quando entrei no Laboratório de Genética Humana. Além da parceria no laboratório, dividi com elas grandes momentos, muita diversão, muitas risadas e muitas conversas sérias, científicas e bobas. No caso da Fabi, dividimos também a casa por algum tempo. Hoje, sei que sempre tem cantinho para mim na casa delas no Rio...

**À Júlia Genro** que, mais do que minha dupla científica, é uma amiga muito especial, companheira e que está sempre, sempre mesmo, disponível para ajudar, beber um vinho, bater papo ou mesmo para uma terapia de choque, quando for necessário.

**À Nina Roth Mota**, que apareceu mais tarde na minha jornada acadêmica, mas que chegou a tempo de alegrar e ocupar um espaço importante na minha vida. Uma parceira especial para viagens, banho de sol no verão e também na hora do trabalho. Além disso, não posso deixar de agradecer também pela paciência em me levar para o Campus quando eu estava de braço quebrado e, ainda, de péssimo humor.

**À Katiane Silva**, que foi uma surpresa mais do que especial desse doutorado. Amiga companheira, presente, que topa qualquer parada, sempre. Minha dupla dinâmica, não me deixa nunca esquecer que “quem tem amigos nunca está sozinho”.

**À Tati Roman**, que tem sido uma grande companheira e amiga nesses últimos tempos. Além de assessora científica em assuntos do TDAH, é sempre uma companhia divertidíssima em nossas aventuras por aí. Agradeço, também, pelas conversas sérias e pela oportunidade de dar aulas na disciplina de Genética.

Por fim, mas não por último, agradeço à minha família, em especial aos **meus pais, João e Vera e às minhas irmãs, Joana e Betânia**. Esse talvez seja o agradecimento mais difícil, porque tenho simplesmente que agradecer por tudo. Pelo amor inabalável, pelo incentivo constante e pelo apoio irrestrito. A certeza de que posso sempre contar com eles, incondicionalmente e independentemente das minhas escolhas, foi certamente essencial para que eu chegasse aqui. Agradeço pela paciência, por entenderem minhas ausências, pela falta de cobranças, pelo auxílio financeiro, por sempre poder “voltar para casa”...

Também agradeço meus cunhadinhos queridos, Leonardo e Alexandre, e ao Sushi, que colaboram, cada um a seu modo, para tornar nossa família uma “grande família”.

## SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Unidades .....	10
Resumo .....	12
Abstract .....	14
Capítulo I. Introdução .....	16
1.1. Considerações Gerais .....	17
1.2. Critérios Diagnósticos e Subtipos .....	19
1.3. Comorbidades .....	22
1.3.1. Transtornos por Uso de Substâncias Psicoativas .....	23
1.4. Fisiopatologia e Etiologia .....	25
1.4.1. Estudos de Neuroimagem .....	25
1.4.2. Estudos Neuropsicológicos .....	27
1.4.3. Sistemas de Neurotransmissão .....	29
1.4.4. Fatores Ambientais .....	30
1.4.5. Fatores Genéticos .....	31
1.5. Tratamento .....	35
1.5.1. Tratamento Farmacológico em Adultos .....	37
1.5.2. Mecanismo de Ação do Metilfenidato .....	40
1.6. Farmacogenética do Metilfenidato .....	41
Capítulo II. Justificativas e Objetivos .....	47
Capítulo III. Response to methylphenidate is not influenced by <i>DAT1</i> polymorphisms in a sample of Brazilian adult patients with ADHD .....	50
Capítulo IV. Adrenergic $\alpha$ 2a receptor gene is not associated with methylphenidate response in adults with ADHD .....	59
Capítulo V. No significant association between genetic variants in seven candidate genes and response to methylphenidate treatment in adult patients with ADHD .....	67
Capítulo VI. A haplotype analysis is consistent with the role of functional <i>HTR1B</i> variants in alcohol dependence .....	81
Capítulo VII. Discussão .....	99



Referências .....	105
Anexos .....	120
Anexo 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	120
Anexo 2 Aprovação – Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde (HCPA) .....	121

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

- 5-HTT* Gene da proteína transportadora de serotonina
- ADRA2A* Gene do receptor alfa-adrenérgico 2A
- AMP Anfetamina
- APA Associação Norte-Americana de Psiquiatria
- CDH13* Gene da caderina 13
- CES1* Gene da enzima carboxil-esterase 1A1
- CHRNA4* Gene do receptor nicotínico subunidade alfa-4 neuronal
- CID-10 Classificação Internacional de Doenças, 10ª Ed.
- COMT* Gene da enzima catecol-O-metiltransferase
- DAT1* Gene da proteína transportadora de dopamina
- DBH* Gene da enzima dopamina-beta hidroxilase
- DRD2* Gene do receptor D2 de dopamina
- DRD4* Gene do receptor D4 de dopamina
- DRD5* Gene do receptor D5 de dopamina
- DSM-IV Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais, 4ª Ed.
- DTI Imagem por tensor de difusão
- fMRI Ressonância Magnética Funcional
- HTR1B* Gene do receptor 1B de serotonina
- HTR2A* Gene do receptor 2A de serotonina
- IMpACT *International Multicentre persistent ADHD CollaboraTion*
- MAOA* Gene da enzima monoamino oxidase A
- MPH Metilfenidato
- NET1* Gene da proteína transportadora de noradrenalina
- OMS Organização Mundial da Saúde
- QI Quociente de Inteligência
- SLC6A2* Gene da proteína transportadora de noradrenalina
- SLC6A3* Gene da proteína transportadora de dopamina
- SLC6A4* Gene da proteína transportadora de serotonina
- SNAP25* Gene da proteína associada ao sinaptossoma de 25kDa
- SNP Polimorfismo de base única

TC Transtorno de Conduta  
TDAH Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade  
TOD Transtorno Opositor Desafiante  
TPAS Transtorno de Personalidade Antisocial  
*TPH2* Gene da enzima triptofano hidroxilase 2  
TUSP Transtornos por Uso de Substâncias Psicoativas  
VNTR Número variável de repetições em *tandem*  
WAIS-R Escala Wechsler de inteligência para adultos

## RESUMO

O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) é comum em adultos e caracteriza-se por sintomas persistentes de desatenção, hiperatividade e impulsividade. Clinicamente, o TDAH é um fenótipo bastante heterogêneo e, frequentemente, encontra-se associado a diversos outros transtornos psiquiátricos. A contribuição genética é substancial no TDAH e diversos genes de pequeno efeito têm sido associados com o desenvolvimento do transtorno. O metilfenidato (MPH) representa o principal agente farmacológico usado no tratamento e seu mecanismo de ação parece envolver a potencialização da transmissão catecolaminérgica no córtex pré-frontal. Estudos farmacogenéticos têm investigado o papel de diversas variantes genéticas, principalmente em sistemas de neurotransmissão, na resposta ao tratamento com MPH. No entanto, esses estudos têm focado quase que exclusivamente no tratamento de crianças com TDAH. No presente trabalho foi investigada a associação entre 17 polimorfismos genéticos, em nove genes candidatos (*DAT1*, *ADRA2A*, *5-HTT*, *HTR1B*, *TPH2*, *DBH*, *DRD4*, *COMT* e *SNAP25*), e a resposta ao tratamento com MPH. A amostra foi composta de 165 adultos com TDAH, diagnosticados de acordo com os critérios do DSM-IV. A gravidade dos sintomas dos pacientes foi avaliada antes e após um mês de uso de MPH através da aplicação das sub-escalas SNAP-IV e da escala CGI-S. Também avaliamos uma amostra de 136 dependentes de álcool e 237 controles, em um estudo de associação envolvendo o gene *HTR1B*. A resposta ao MPH foi analisada através de avaliações categórica e dimensional da redução nos sintomas após o uso de MPH. Foi observada uma redução significativa nos escores de gravidade total dos sintomas após o tratamento, sendo que 83% dos pacientes foram classificados como respondedores e 17% como não respondedores. Nossos resultados indicaram que nenhuma das variantes genéticas investigadas apresenta efeitos significativos na variabilidade de resposta ao tratamento com MPH. Interpretamos a dificuldade de identificar variantes genéticas envolvidas na resposta ao tratamento como o reflexo da complexidade clínica e etiológica do TDAH.

Exemplo disso é o fato de que o gene *HTR1B*, que apresenta resultados positivos para associação com o TDAH em meta-análises e em um estudo com crianças da nossa população, não se mostrou associado com o TDAH em adultos ou com a resposta ao MPH, mas sim com o alcoolismo nesse estudo. Novas investigações, em amostras maiores, serão necessárias para que seja alcançado maior sucesso nos estudos farmacogenéticos envolvendo o MPH ou outros fármacos no tratamento do TDAH.

Palavras-chave: TDAH, MPH, farmacogenética, dependência de álcool.

## ABSTRACT

Attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD) has a high prevalence in adults and it is characterized by pervasive symptoms of inattention, hyperactivity and impulsivity. Clinically, ADHD is a very heterogeneous disorder frequently associated with other psychiatric conditions. The genetic contribution in ADHD is substantial and several genes of small effect have been associated with ADHD susceptibility. Methylphenidate (MPH) is the primary agent used in pharmacological intervention for ADHD. Its mechanism of action is believed to potentiate catecholamine transmission in the pre-frontal cortex. Pharmacogenetic studies have been investigating the role of genetic variants in the response to the treatment with MPH. However, previous studies have focused almost exclusively in the treatment of children with ADHD. In this study, we investigated the association between 17 polymorphisms, in 9 candidate genes (*DAT1*, *ADRA2A*, *5-HTT*, *HTR1B*, *TPH2*, *DBH*, *DRD4*, *COMT* and *SNAP25*), and the response to MPH. The sample comprised 165 adults with ADHD diagnosed according to DSM-IV criteria. We also evaluated a sample of 136 alcohol dependents and 237 control subjects, in an association study involving the *HTR1B* gene. The response to MPH was assessed by both categorical and dimensional approaches through the SNAP-IV sub-scales and the CGI-S scale, applied at the beginning and after the 30<sup>th</sup> day of treatment. We detected a significant reduction in SNAP-IV total scores during the follow-up period. According to the categorical definition of MPH response, 83% of the patients were classified as responders and 17% were classified as non-responders. Our results indicated that none of the investigated variants showed significant effects on the MPH response. We interpret the difficulty of identifying genetic variants involved in response to treatment as a reflection of the clinical and etiological complexity of ADHD. For example, we did not find association of the *HTR1B* gene with ADHD nor with treatment response to MPH in our adult sample, but it was in fact associated with alcohol dependence. However, this gene has previously shown positive results for association with children ADHD in meta-analysis and also in a study with children of the same

population of the current work. More investigations with larger sample sizes will be need to achieve greater success in pharmacogenetic studies involving the MPH or other drugs used in the treatment of ADHD.

Key-words: ADHD, MPH, pharmacogenetics, alcohol dependence.

## Capítulo I

---

### INTRODUÇÃO



## 1.1 Considerações Gerais

O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) é caracterizado por um perfil comportamental decorrente de sintomas de desatenção, agitação motora e impulsividade, que são mais frequentes e severos do que o observado e esperado em indivíduos com nível de desenvolvimento comparável. É um dos diagnósticos psiquiátricos infantis mais comuns e, embora inicialmente reconhecido como um problema restrito à infância, atualmente sabe-se que os sintomas e os prejuízos associados ao transtorno podem persistir durante a vida adulta. Estudos de meta-análise apontam uma prevalência do transtorno de 5,3% em crianças e adolescentes (Polanczyk e cols. 2007) e de 2,5% em adultos (Simon e cols. 2009).

Apesar da existência de uma tríade sintomatológica básica (desatenção, hiperatividade e impulsividade), os pacientes com TDAH formam um grupo psiquiátrico bastante heterogêneo clinicamente o que se reflete, por exemplo, na existência de diferentes subtipos do transtorno e na presença de outras doenças psiquiátricas associadas. Além disso, existe também uma grande variabilidade na gravidade e persistência dos sintomas ao longo da vida e nas taxas de prevalência do TDAH entre os sexos. Em conjunto, esses dados sugerem que o TDAH é um fenótipo muito complexo, o que provavelmente é também indicativo da presença de heterogeneidade etiológica. Isso significa que fatores genéticos e ambientais diferentes devem atuar na manifestação das características que compõem os vários quadros clínicos do transtorno (Stergiakouli e Thapar, 2010; Wallis, 2010; Wilens e Spencer, 2010; Purper-Ouakil e cols. 2011).

De fato, sabe-se que, ao longo do desenvolvimento, os sintomas do TDAH tendem a diminuir, podendo haver remissão total dos sintomas em algumas crianças. Faraone e cols. (2006), em uma meta-análise de estudos longitudinais que seguiram crianças com TDAH até o início da vida adulta, encontraram uma taxa de persistência de 15% quando considerado o diagnóstico completo e 40% a 60% quando os casos de TDAH em remissão parcial foram incluídos. Publicações mais recentes confirmam esses resultados, tanto para meninos quanto para meninas com TDAH (Biederman e cols. 2010<sub>a,b</sub>).

Em conjunto, os estudos longitudinais indicam que, apesar da variabilidade observada nas taxas de persistência, a maioria das crianças diagnosticadas com TDAH continua a ter sintomas clinicamente significativos na vida adulta, independentemente de preencherem os critérios completos para o diagnóstico adulto (Faraone e cols. 2006; Biederman e cols. 2010<sub>a,b</sub>; Kieling e Rohde, 2011). As diferenças observadas parecem ser, em grande parte, devido à utilização de diferentes definições de persistência entre os estudos.

Embora não esteja totalmente esclarecido por que alguns casos de TDAH persistem até a vida adulta, enquanto outros apresentam remissão dos sintomas, alguns estudos têm sugerido possíveis preditores envolvidos na persistência do diagnóstico. Diversos fatores, como a presença de comorbidades, a gravidade dos sintomas do TDAH na infância, a presença de psicopatologias nos pais e adversidades psicossociais, já foram associados com a persistência do TDAH em adultos (Lara e cols. 2009, Biederman e cols. 2011). Outros aspectos, os quais poderiam dificultar a detecção dos sintomas, tais como a diminuição da sensibilidade dos instrumentos diagnósticos na vida adulta e as mudanças comportamentais/ambientais inerentes do avançar da idade também já foram discutidos por alguns autores (Biederman e cols. 2011). Ainda, considerando a marcante heterogeneidade clínica do TDAH, é plausível que uma vulnerabilidade genética distinta possa estar atuando nos casos persistentes (Franke e cols. 2010).

O TDAH provoca um grande impacto negativo em diversas áreas da vida dos pacientes e seus familiares, que vai além do que poderia ser explicado pela presença concomitante de outros transtornos psiquiátricos (Garcia e cols., 2010). Crianças e adultos com o transtorno apresentam problemas de auto-estima, prejuízos acadêmicos e de relacionamentos sociais, os quais estão associados com diversos desfechos, conforme os diferentes estágios do desenvolvimento. Crianças e adolescentes, por exemplo, apresentam altas taxas de repetência, suspensões, expulsões e abandono escolar, além de problemas de conduta, delinquência, experimentação e abuso precoce de substâncias psicoativas. Em adultos, a presença do TDAH está associada com altas taxas de acidentes de

trânsito, alta frequência de trocas de empregos e maiores taxas de separações e divórcios (Kieling e Rohde, 2011).

## **1.2 Critérios Diagnósticos e Subtipos**

Atualmente, existem dois sistemas classificatórios utilizados em psiquiatria: a Classificação Internacional de Doenças (CID-10), da Organização Mundial da Saúde (OMS, 1993), e o Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais (DSM-IV), da Associação Norte-Americana de Psiquiatria (APA, 1994). Embora os dois sistemas utilizem nomenclaturas diferentes para o transtorno, “Transtorno Hiperkinético” na CID-10 e “Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade” no DSM-IV, ambos apresentam uma lista muito similar de sintomas para caracterizar a doença (Kieling e Rohde, 2011).

De acordo com o DSM-IV (APA, 1994), sistema utilizado na maioria das pesquisas científicas, a sintomatologia do TDAH é subdividida nas áreas de desatenção e hiperatividade-impulsividade (Tabela 1). São critérios diagnósticos para esse transtorno a presença de seis ou mais sintomas em uma ou ambas as áreas, por no mínimo seis meses, com caracterização de prejuízo em função destes sintomas em mais de um ambiente e início do prejuízo antes dos sete anos de idade. Partindo dessa classificação, podem ser reconhecidos três subtipos clínicos do transtorno, conforme a presença de um mínimo de seis sintomas em uma ou ambas as áreas: predominantemente desatento, predominantemente hiperativo-impulsivo e combinado.

É importante ressaltar que sintomas isolados de desatenção, hiperatividade e impulsividade podem ser resultado de problemas nas relações familiares, sociais e de sistemas educacionais ou ambientes de trabalho inapropriados. Da mesma forma, a presença de sintomas em apenas um ambiente, em casa, por exemplo, pode estar refletindo um desajuste específico do indivíduo a este determinado ambiente. Portanto, o diagnóstico do TDAH requer também que os sintomas sejam contextualizados na história de vida do paciente. Além disso, até o momento, não existe um marcador biológico suficientemente sensível e

específico utilizado no processo diagnóstico do transtorno, que é essencialmente clínico (Kieling e Rohde, 2011).

Outro aspecto importante do diagnóstico do TDAH está relacionado com o fato de que a descrição dos sintomas, especialmente os de hiperatividade-impulsividade, parece se ajustar melhor às crianças. No entanto, esses sintomas devem ser interpretados e adaptados para o contexto da vida adulta. Em adultos, a intensa hiperatividade motora da infância, por exemplo, tende a converter-se em uma sensação subjetiva de inquietude. Alguns pacientes também podem escolher trabalhos de intensa atividade, ou passar longas horas trabalhando, como uma maneira de lidar com seus sintomas de hiperatividade (Adler, 2008; Kieling e Rohde, 2011).

Com relação à prevalência dos subtipos, o combinado é o mais comum, tanto em amostras de crianças quanto de adultos, seguido pelo predominantemente desatento (Rohde, 2002; Grevet e cols. 2006; Wilens e Spencer, 2010). Os pacientes do subtipo combinado apresentam uma taxa mais elevada de comorbidades e maior gravidade. Alguns autores sugerem que o subtipo combinado poderia simplesmente representar uma forma mais grave do transtorno, já que apresenta um número maior de sintomas (Wilens e Spender, 2010).

## Tabela 1: Critérios diagnósticos do DSM-IV para o Transtorno de Déficit de Atenção/ Hiperatividade (APA, 1994)

---

### Critérios diagnósticos do DSM-IV para transtorno de déficit de atenção/hiperatividade (APA, 1994)

---

#### A. Ou (1) ou (2)

(1) Seis ou mais dos seguintes sintomas de desatenção persistiram pelo período mínimo de 6 meses, em grau mal adaptativo e inconsistente com o nível de desenvolvimento:

##### Desatenção:

- (a) Frequentemente não presta atenção a detalhes ou comete erros por omissão em atividades escolares, de trabalho ou outros
- (b) Frequentemente tem dificuldades de manter a atenção em tarefas ou atividades lúdicas
- (c) Frequentemente parece não ouvir quando lhe dirigem a palavra
- (d) Frequentemente não segue instruções e não termina seus deveres escolares, tarefas domésticas ou deveres profissionais (não é devido a comportamentopositor ou incapacidade de entender as instruções).
- (e) Frequentemente tem dificuldades para organizar tarefas e atividades
- (f) Frequentemente evita, reluta, detesta se envolver em tarefas que exijam esforço mental contínuo (como tarefas escolares ou deveres de casa)
- (g) Frequentemente perde coisas necessárias para tarefas ou atividades (p. ex., brinquedos, tarefas escolares, lápis, livros ou outros materiais)
- (h) Frequentemente é distraído por estímulos ambientais alheios à tarefa
- (i) Frequentemente é esquecido em atividades diárias

(2) Seis ou mais dos seguintes sintomas de hiperatividade persistiram pelo período mínimo de 6 meses, em grau mal adaptativo e inconsistente com o nível de desenvolvimento:

##### Hiperatividade:

- (a) Frequentemente agita as mãos ou os pés ou se remexe na cadeira
- (b) Frequentemente abandona sua cadeira em sala de aula ou em situações nas quais se espera que permaneça sentado
- (c) Frequentemente corre ou escala em demasia em situações impróprias (em adolescentes ou adultos pode ser apenas sensações subjetivas de inquietude)
- (d) Frequentemente tem dificuldades de brincar ou se envolver silenciosamente em atividades de lazer
- (e) Frequentemente está "a mil" ou muitas vezes age como se estivesse "a todo vapor"
- (f) Frequentemente fala em demasia

##### Impulsividade

- (g) Frequentemente dá respostas precipitadas antes das perguntas terem sido completamente formuladas
- (h) Frequentemente tem dificuldades de esperar a sua vez
- (i) Frequentemente interrompe ou se intromete em assuntos alheios (p.ex., em conversas ou brincadeiras)

B. Alguns sintomas de hiperatividade/impulsividade ou desatenção causadores de comprometimento estavam presentes antes dos sete anos de idade.

C. Algum comprometimento causado pelos sintomas está presente em dois ou mais contextos (p.ex., na escola e em casa).

D. Deve haver claras evidências de comprometimento clinicamente importante no funcionamento social, acadêmico ou oposicional.

E. Os sintomas não ocorrem exclusivamente durante o curso de um transtorno global do desenvolvimento, esquizofrenia ou outro transtorno psicótico, nem são melhor explicados por outro transtorno mental (p.ex., transtorno do humor, transtorno de ansiedade, transtorno dissociativo ou transtorno de personalidade).

#### Codificar com base no tipo:

**314.00 Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade, tipo combinado:** se tanto o critério A1 quanto o critério A2 são satisfeitos durante os últimos seis meses.

**314.01 Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade, tipo predominantemente desatento:** se o critério A1 é satisfeito, mas o Critério A2 não é satisfeito durante os últimos seis meses

**314.02 Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade, tipo predominantemente hiperativo/impulsivo:** se o critério A2 é satisfeito, mas o critério A1 não é satisfeito durante os últimos seis meses.

**Nota para codificação:** Para indivíduos (em especial adolescentes e adultos) que atualmente apresentam sintomas que não mais satisfazem todos os critérios, especificar "em remissão parcial".

### 1.3 Comorbidades

Uma proporção significativa dos pacientes com TDAH apresenta comorbidades psiquiátricas associadas, que parecem influenciar negativamente o prognóstico do paciente e exacerbar os desfechos negativos (Wilens e Spender, 2010; Kieling e Rohde, 2011). De forma geral, pacientes com TDAH apresentam altas taxas de transtorno de conduta (TC), transtorno opositor desafiante (TOD), transtorno de personalidade antisocial (TPAS), transtornos de humor e ansiedade e transtornos por uso de substâncias psicoativas (TUSP). Em crianças os transtornos disruptivos do comportamento (TC e TOD) são mais prevalentes, estando presentes em torno de 40% a 50% dos casos (Rohde e cols. 1999; Biederman e cols. 2004). Já em adultos, os transtornos de humor e de ansiedade são mais frequentes, sendo encontrados em aproximadamente 40% e 50% dos casos, respectivamente (Biederman, 2004; Grevet e cols. 2006; Newcorn 2008).

Interessantemente, essa diferença na prevalência das comorbidades observadas entre crianças e adultos com TDAH parece enquadrar-se num contexto de desenvolvimento do transtorno ao longo da vida. Sabe-se que na infância o TDAH é aproximadamente duas vezes mais comum em meninos do que em meninas, assim como é sabido que os transtornos disruptivos do comportamento são mais frequentes no sexo masculino (Polanczyk e Jensen, 2008). Assim, a presença desses transtornos em meninos com TDAH os torna mais “salientes”, fazendo com que eles sejam mais comumente encaminhados ao tratamento e mais facilmente diagnosticados. Ao contrário, as meninas com TDAH apresentam predomínio dos sintomas de desatenção, causando menos incômodo às famílias e à escola e sendo, portanto, menos encaminhadas ao tratamento (Rohde e Halpern, 2004; Biederman e cols. 2004; Stergiakouli e Thapar, 2010). Já na vida adulta, acredita-se que as próprias mulheres com TDAH tendem a buscar tratamento, o que, conseqüentemente, acaba refletindo em uma distribuição mais balanceada entre os sexos (Biederman e cols. 2004). Portanto, considerando que os transtornos de humor e ansiedade são mais frequentes no sexo feminino (Kessler 2003, 2005), a frequência dessas comorbidades aumenta nas amostras de pacientes adultos com TDAH. Além disso, também é sugerido que os prejuízos

causados pela presença dos transtornos de humor em mulheres com TDAH sejam um fator preditivo importante da busca de tratamento (Fischer e cols. 2007). No entanto, embora essas relações ajudem a explicar a diferença de afetados quanto ao sexo entre crianças e adultos com TDAH, ainda não é possível esclarecer totalmente quais mecanismos estão atuando na formação dos diferentes perfis de comorbidades entre os sexos.

### **1.3.1 Transtornos por Uso de Substâncias Psicoativas (TUSP)**

O TDAH, especialmente quando associado aos transtornos disruptivos do comportamento, é um fator de risco importante para o desenvolvimento de TUSP (Szobot e Bukstein, 2008; Huizink e cols. 2009; Langley e cols. 2010; Wilens e Morrison, 2011; Charach e cols. 2011; Lee e cols. 2011). Estudos que investigam a prevalência de transtornos psiquiátricos em grupos de usuários de substâncias psicoativas têm indicado que 25% dos adultos e 50% dos adolescentes com TUSP são diagnosticados com TDAH. Além disso, o TDAH também está associado com um início mais precoce e maior gravidade do TUSP (Wilens e Morrison, 2011). Dados de um estudo de meta-análise recente, que incluiu 27 estudos, indicam que o diagnóstico de TDAH na infância é um forte preditor do desenvolvimento de abuso ou dependência de drogas lícitas (nicotina e álcool) e ilícitas (maconha, cocaína e outras não-especificadas) na adolescência e vida adulta. Fortalecendo esses achados, os dados da meta-análise também mostram que essas associações são em grande parte independentes dos fatores demográficos e metodológicos que variam entre os estudos (Lee e cols. 2011). Esses resultados têm implicações importantes no manejo dos pacientes com TDAH, visto que existem evidências de que o tratamento precoce dos pacientes pode retardar ou reduzir o desenvolvimento de TUSP na adolescência (Wilens e Morrison, 2011).

Uma das hipóteses propostas para explicar a forte associação entre o TDAH e o desenvolvimento de TUSP é a da automedicação. De acordo com essa idéia, os pacientes com TDAH usariam substâncias psicoativas para minimizar

déficits atencionais e alterações de humor, além de induzir o sono (Wilens e cols. 2007). Essa hipótese tem sido principalmente evocada para o uso de nicotina (Gehricke e cols. 2009), pois diversos estudos têm demonstrado que essa substância, pelas suas propriedades de estimulante do sistema nervoso central, melhora aspectos do desempenho cognitivo em indivíduos com e sem o diagnóstico de TDAH (Levin e cols. 1998; Levin e Rezvani, 2000; Bekker e cols. 2005; Poltavski e Petros, 2006; Potter e cols. 2006).

Um segundo mecanismo proposto para explicar essas associações está relacionado com o modelo de desinibição comportamental. De acordo com essa hipótese, o TDAH e o TUSP, juntamente com os transtornos disruptivos do comportamento (TC, TOD e TPAS), fariam parte de um espectro de comportamentos e patologias que compartilham uma via de susceptibilidade, que reflete numa tendência à desinibição comportamental (Iacono e cols. 2008; Young e cols. 2009). O conceito de desinibição comportamental compreende o déficit na habilidade de inibir ações que visam a gratificação imediata, mesmo que estas possam levar a consequências negativas a médio e longo prazo (Young e cols. 2009). Nesse contexto, o aparecimento do TUSP seria um dos desfechos de uma cascata de desinibição comportamental que inicia na infância e engloba traços específicos de personalidade, tais como extroversão, impulsividade e busca de novidades, e alguns transtornos, como o TDAH, o TC e o TOD. Esse conjunto de comportamentos seria interligado pela presença de fatores de risco comuns, tanto genéticos quanto ambientais. Ao longo do desenvolvimento, novos fatores poderiam modelar a expressão desses fenótipos, o que explicaria por que, mesmo dentro de uma via de susceptibilidade comum, nem todos os indivíduos vulneráveis apresentam o mesmo desfecho (Iacono e cols. 2008).

É importante ressaltar ainda que os modelos de automedicação e de desinibição comportamental, propostos para explicar a associação entre o TDAH e o TUSP, não são mutuamente excludentes. Estudos do nosso grupo em pacientes adultos com TDAH, inclusive, corroboram ambas as hipóteses. Em um primeiro estudo, foi demonstrado uma associação entre o uso de nicotina e pior desempenho no subteste cubos da Escala Wechsler de inteligência para adultos (WAIS-R), o que poderia ser compreendido como uma forma de automedicação



desses pacientes para suas dificuldades cognitivas (Kalil e cols. 2008). Uma segunda avaliação, que comparou pacientes usuários e não usuários de nicotina, observou uma maior frequência de TUSP e de TPAS nos pacientes usuários de nicotina. Além disso, o uso de nicotina também se mostrou associado com escores elevados de procura de novidades e baixos de evitação de dano (Sousa e cols. 2011). Esse segundo conjunto de resultados, portanto, favorece o modelo de desinibição comportamental.

## **1.4 Fisiopatologia e Etiologia**

Evidências numerosas confirmam uma base neurobiológica para o TDAH. Dados convergentes de estudos de neuroimagem, neuropsicológicos e genéticos indicam que diversas anormalidades estruturais e funcionais, de regiões encefálicas específicas, estão envolvidas no desenvolvimento do transtorno. É consenso também que, provavelmente, múltiplas vias causais estejam atuando no aparecimento dos diferentes quadros clínicos do TDAH, juntamente com diversos fatores mediadores e moderadores da expressão dos sintomas e déficits associados ao transtorno. Portanto, o TDAH é claramente um transtorno mental de etiologia multifatorial, causado pela confluência de muitos fatores de risco, tanto genéticos como ambientais (Tripp e Wickens, 2009; Makris e cols. 2009; Curatolo e cols. 2010; Purper-Ouakil e cols. 2011).

### **1.4.1 Estudos de Neuroimagem**

As regiões cerebrais que têm sido apontadas pelos estudos de neuroimagem incluem os córtices frontal e parietal, os núcleos da base, o cerebelo, o hipocampo e o corpo caloso (Purper-Ouakil e cols. 2011). Nesse sentido, os achados estruturais têm demonstrado que, em pacientes com TDAH, essas regiões podem apresentar alterações estruturais detectáveis, que acarretam em prejuízo funcional. Entre as alterações morfológicas, os achados

mais consistentes indicam que o córtex pré-frontal (responsável por funções cognitivas complexas) apresenta perda de substância cinzenta e assimetria entre córtices direito e esquerdo; os núcleos da base (responsáveis pelo controle motor) apresentam volume diminuído e também perda de simetria; e o cerebelo (responsável, entre outras, pelo controle da coordenação motora) apresenta redução global de volume (Tripp e Wickens, 2009; Curatolo e cols. 2010). Além disso, também existem fortes evidências de que pacientes com TDAH apresentam uma redução do tamanho global do cérebro (Tripp e Wickens, 2009).

Os estudos de neuroimagem funcionais, que avaliam o grau de ativação cerebral associado a testes neuropsicológicos, corroboram os achados estruturais, demonstrando que pacientes com TDAH apresentam uma diminuição na atividade de circuitos neuronais relacionados com as regiões cerebrais citadas acima (Makris e cols., 2009; Purper-Ouakil e cols. 2011). Por exemplo, Rubia e cols. (2010), em um estudo de ressonância magnética funcional, observaram que crianças com TDAH, quando comparadas com crianças sem a doença, apresentavam uma menor ativação de áreas específicas do córtex pré-frontal, durante testes de controle inibitório.

Um grupo de pesquisadores tem sugerido que crianças e adolescentes com TDAH apresentam um atraso na maturação do córtex, especialmente das regiões pré-frontais (Shaw e cols. 2007; 2011). Em um primeiro estudo, esses autores compararam 824 imagens de ressonância magnética de cérebros de 223 crianças com TDAH e 223 crianças sem a doença. Os resultados indicaram que o padrão de desenvolvimento cerebral das crianças com TDAH era semelhante ao das crianças sem a doença, porém o desenvolvimento diferiu no tempo. Dessa forma, sugere-se que o transtorno possa estar mais relacionado a um atraso no desenvolvimento do que a um desvio nesse processo (Shaw e cols. 2007). Em um segundo estudo, utilizando a mesma abordagem e metodologia do estudo anterior, os autores compararam o padrão de desenvolvimento cerebral de crianças com TDAH e crianças sem a doença, porém desta vez com avaliação para sintomas de hiperatividade e impulsividade. Os resultados desse estudo continuam apontando um atraso maior na maturação do córtex das crianças com TDAH, porém também indicam que as crianças sem o diagnóstico, mas com

sintomas do transtorno, exibem o mesmo padrão de atraso no desenvolvimento, que está relacionado com a gravidade de sintomas de hiperatividade e impulsividade. Esses achados, em conjunto, evidenciam a importância de compreender o TDAH também através de uma perspectiva dimensional (Shaw e cols. 2011).

Mais recentemente, o avanço das técnicas de neuroimagem tem possibilitado uma melhor integração dos achados estruturais e funcionais. Nesse contexto, duas ferramentas de estudo, a ressonância magnética funcional em estado de repouso (*resting* fMRI) e a técnica de imagem por tensor de difusão (DTI), têm possibilitado avaliar a conexão entre os diferentes circuitos neuronais implicados na fisiopatologia do TDAH, tanto do ponto de vista funcional quanto anatômico. A hipótese levantada por essas investigações é de que disfunções dentro de circuitos neuronais específicos, ou entre eles, podem levar a uma disfunção neuronal mais abrangente. Além disso, supõe-se que possíveis alterações nas conexões entre os circuitos poderiam estar igualmente e independentemente associadas ao transtorno. Os achados iniciais indicam alterações anatômicas e funcionais na conexão neuronal de pacientes com TDAH. Coletivamente, esses resultados sugerem que os sintomas nucleares do transtorno podem ser derivados de uma desregulação da plasticidade cortical durante o desenvolvimento cerebral, resultando em padrões de conexões alterados (Konrad e Eickhof, 2010; Liston e cols. 2011).

#### **1.4.2 Estudos Neuropsicológicos**

Alterações neuropsicológicas são um componente importante do TDAH, tanto na infância e adolescência quanto na vida adulta. Diversos estudos têm mostrado claramente que indivíduos com TDAH apresentam prejuízos marcantes em diversos domínios de função executiva, principalmente os de controle inibitório, vigilância, memória de trabalho e planejamento. Além disso, déficits de domínio motivacionais também têm sido observados em indivíduos com TDAH,

em especial dificuldades em lidar com situações que implicam em recompensas tardias (Sonuga-Barke e cols. 2008; Tripp e Wickens, 2009).

Diante dessas observações, dois modelos principais foram propostos para explicar os déficits cognitivos e comportamentais observados no TDAH. O primeiro modelo, desenvolvido por Barkley (1997), enfatiza o papel da disfunção executiva secundariamente a um controle inibitório deficiente, resultante de alterações no circuito frontal-estriatal. Já de acordo com o segundo modelo, os prejuízos neuropsicológicos do TDAH estariam mais relacionados com as falhas na sinalização de recompensas tardias, sendo estas secundárias aos déficits nos processos motivacionais relacionados ao circuito frontal ventral, ao estriado e às ramificações mesolímbicas (Sonuga-Barke, 2005).

De fato, o que tem sido observado é que tanto os déficits de sinalização da recompensa tardia quanto os déficits executivos baseados no controle inibitório compartilham elementos comuns. Além disso, ambos os modelos são considerados insuficientes e simplistas, principalmente se considerado a grande heterogeneidade na apresentação clínica do TDAH que resulta na complexidade neuropsicológica. Portanto, fica evidente a impossibilidade de adoção de um único modelo. Nesse sentido, tendo em mente a etiologia multifatorial do transtorno, é provável que disfunções em diversos circuitos neuronais, isoladamente ou em conjunto, estejam atuando para a formação de déficits neuropsicológicos específicos (Sonuga-Barke e cols. 2008; Louzã Neto, 2010).

No TDAH, déficits neuropsicológicos, especialmente os de função executiva, têm sido propostos como endofenótipos candidatos (Rommelse e cols. 2008; Kebir e Joover, 2011). Na genética psiquiátrica, esse termo é usado para características que seriam fenótipos intermediários entre o efeito do gene e o transtorno mental propriamente dito. Eles podem ser definidos como traços intermediários em uma cadeia de causalidade com origens genéticas, tendo por desfecho um transtorno multifatorial (Gottesman e Gould, 2003).

### 1.4.3 Sistemas de Neurotransmissão

A heterogeneidade nas manifestações clínicas do TDAH, em conjunto com a variabilidade dos achados de neuroimagem e neuropsicológicos, certamente reflete uma grande complexidade de alterações em diferentes sistemas de neurotransmissão. Evidências atuais apóiam o envolvimento dos sistemas catecolaminérgico e serotoninérgico no TDAH, embora pareça razoável supor que outros sistemas possam também estar envolvidos e, muito provavelmente, interagindo para a manifestação de um fenótipo final.

As catecolaminas, dopamina e noradrenalina, foram primeiramente implicadas no TDAH, visto que as teorias iniciais da fisiopatologia sugeriam que os sintomas desse transtorno seriam decorrentes de uma disfunção fronto-límbica, resultante de uma hipofunção dopaminérgica nessas regiões. Essa teoria foi em grande parte fortalecida pelas observações de que o metilfenidato (MPH), principal agente farmacológico usado no tratamento dos pacientes com TDAH, age principalmente nos sistemas de neurotransmissão dopaminérgico e noradrenérgico (Biederman e Spencer, 1999). Posteriormente, novas evidências têm favorecido e confirmado um papel importante desses neurotransmissores na fisiopatologia do TDAH (Arnsten e Li, 2005; Prince, 2008). O córtex pré-frontal é uma das regiões cerebrais essenciais no entendimento de inúmeras características clínicas do TDAH e, dentro deste contexto, sabe-se que a dopamina e a noradrenalina exercem uma função moduladora crucial. Além disso, a ação de outros fármacos também eficazes no controle dos sintomas do transtorno, tais como a atomoxetina e a clonidina, exercem seus efeitos primeiramente pela ação na transmissão catecolaminérgica (Arnsten, 2009).

Evidências provenientes de diferentes abordagens indicam que mecanismos serotoninérgicos também contribuem para a fisiopatologia do TDAH (Quist e Kennedy, 2001). As primeiras hipóteses surgiram a partir da observação da influência da serotonina em patologias que também são caracterizadas por déficits na inibição comportamental, como o TUSP, o TC e o TPAS. A participação da transmissão serotoninérgica nesses comportamentos é bem estabelecida na literatura (Nordquist e Oreland, 2010). Além disso, axônios serotoninérgicos

ramificam-se para regiões encefálicas que desempenham funções relacionadas com alguns sintomas do TDAH, tais como domínio da cognição e controle motor (Owens e Nemeroff, 1994). Por fim, evidências farmacológicas também apontam para o envolvimento serotoninérgico no TDAH, uma vez que os inibidores seletivos da recaptação da serotonina se mostram benéficos no tratamento de alguns pacientes com esse transtorno (Tandon e Pruett, 2008).

#### **1.4.4 Fatores Ambientais**

Quanto aos fatores ambientais, muito estudos já foram desenvolvidos para que se verificasse a participação de diversos componentes na predisposição ao TDAH. Associações com fatores pré-, peri- e pós-natais, tais como uso de álcool e nicotina pela mãe durante a gestação, baixo peso ao nascer, adversidades psicossociais e má-nutrição, já foram relatadas (Curatolo e cols. 2010; Stergiakouli e Thapar, 2010; Purper-Ouakil, 2011).

No entanto, cabe ressaltar que a maioria dos estudos sobre possíveis agentes ambientais apenas evidenciaram uma associação destes fatores com o TDAH, não sendo possível estabelecer uma relação direta de causa e efeito entre eles. De fato, tem sido sugerido que fatores genéticos podem estar influenciando e confundindo os achados ambientais. Por exemplo, Thapar e cols. (2009), em um estudo conduzido com crianças concebidas através de técnicas de fertilização *in vitro*, avaliaram o risco de desenvolvimento de TDAH associado com o uso de nicotina materno durante a gestação. A hipótese levantada por esses autores é de que se o tabagismo materno durante a gravidez for um fator de risco verdadeiro para o TDAH, a associação será observada independentemente de mãe e filhos serem geneticamente relacionados. Os dados obtidos de 815 famílias indicaram uma associação entre o tabagismo na gravidez e baixo peso ao nascer, independente de a mãe e o filho serem geneticamente relacionados, demonstrando um efeito de risco real. No entanto, para os sintomas de TDAH, a magnitude da associação foi significativamente maior quando mãe e filho eram

geneticamente relacionados, sugerindo efeitos hereditários na associação entre o tabagismo materno e o risco de desenvolvimento do TDAH.

Além disso, os agentes psicossociais associados com o desenvolvimento do TDAH parecem atuar mais como preditores universais do funcionamento adaptativo e emocional das crianças em geral, do que como preditores específicos do TDAH. Dessa forma, eles podem ser considerados como gatilhos não específicos de uma predisposição latente ou como modificadores do curso da doença (Biederman, 2005).

#### **1.4.5 Fatores Genéticos**

Há na literatura um acúmulo de evidências provenientes de estudos familiares, com gêmeos e adotados, mostrando que a contribuição genética no TDAH é substancial (Stergiakouli e Thapar, 2010; Purper-Ouakil e cols., 2011). Faraone e cols. (2005), revisando 20 estudos com gêmeos, estimaram uma herdabilidade de 76% para o transtorno. Outros estudos, no entanto, têm sugerido que a herdabilidade do transtorno em adultos seria significativamente mais baixa do que a demonstrada para crianças, sendo estimada em torno de 30% a 40% (Schultz e cols. 2006; van den Berg e cols. 2006; Boomsma e cols. 2010).

Essa discrepância de resultados gera discussões importantes. Revisões recentes do TDAH em adultos têm sugerido que os relatos de herdabilidade mais baixos podem ser devido, em grande parte, a diferenças metodológicas na avaliação dos sintomas do transtorno; os estudos em adultos envolvem o uso de escalas de auto-avaliação, enquanto que em crianças as avaliações geralmente contam com mais de um observador (pais e professores, por exemplo) (Kooij e cols. 2010; *International Multicentre persistent ADHD CollaboraTion –IMpACT 2011, no prelo*). Dados recentes, ainda em fase de preparação, estimam uma herdabilidade em adultos de 80%, quando os sintomas do transtorno são avaliados através de um índice composto pelas escalas de auto-avaliação e avaliação pelos pais (IMpACT, comunicação pessoal).

Apesar dessa discussão em torno dos valores estimados de herdabilidade para o TDAH, é indiscutível a participação de fatores genéticos no transtorno, tanto em crianças quanto em adultos. Diante disso, diferentes ferramentas de estudos moleculares, como estudos de ligação, de associação e estudos de varredura genômica, têm sido empregadas há bastante tempo na busca pelos genes envolvidos no desenvolvimento do TDAH.

As abordagens clássicas de associação baseiam-se na investigação de genes candidatos, definidos *a priori* por hipóteses neurobiológicas. Nesse contexto, os genes codificadores dos componentes dos sistemas de neurotransmissão têm sido o foco principal. De fato, o candidato inicial dos estudos de associação no TDAH foi o gene da proteína transportadora de dopamina (*SLC6A3/ DAT1*), visto que essa proteína é um dos alvos principais do MPH. No entanto, rapidamente outros genes foram sendo incluídos nos estudos de associação do TDAH e dezenas de genes já foram investigadas (Louzã Neto, 2010).

Os resultados mais consistentes, oriundos de estudos de meta-análise, apontam resultados significativos para o gene do receptor D4 de dopamina (*DRD4*), do receptor D5 (*DRD5*), da proteína transportadora de dopamina (*SLC6A3/ DAT1*), da proteína transportadora de serotonina (*SLC6A4/ 5-HTT*), do receptor 1B de serotonina (*HTR1B*) e da proteína associada ao sinaptossoma de 25 kDa (*SNAP25*) (Gizer e cols., 2009; Faraone e Mick, 2010; Stergiakouli e Thapar, 2010; Purper-Ouakil e cols., 2011). No entanto, cabe ressaltar que vários dos genes analisados na meta-análise conduzida por Gizer e cols. (2009), incluindo alguns com resultados positivos de associação, apresentaram evidências de heterogeneidade significativa entre os estudos. Esses resultados, portanto, indicam a existência de outras variáveis que podem estar influenciando essas associações, tais como aspectos metodológicos dos estudos ou características clínicas dos indivíduos com TDAH. Fica evidente a necessidade de que esses genes sejam melhor investigados, principalmente no que diz respeito à elucidação de possíveis variáveis mediadoras ou moderadoras das associações.

O uso das varreduras genômicas para identificação de locos possivelmente implicados no TDAH vem ganhando espaço considerável na literatura, o que se



deve em parte a um avanço contínuo das técnicas de genotipagem em larga escala. Duas abordagens são utilizadas: as varreduras genômicas de ligação, que investigam a co-segregação de centenas ou milhares de regiões cromossômicas com a doença em famílias de afetados, e as de associação, que utilizam casos e controles na investigação de milhares ou milhões de polimorfismos de base única (SNPs). Embora ambas as ferramentas tenham sido empregadas no TDAH, as varreduras de ligação são predominantemente mais adequadas para detectar fatores genéticos de efeitos maiores. De fato, os resultados para esses estudos têm evidenciado que não há genes de grande efeito contribuindo para o TDAH (Stergiakouli e Thapar, 2010; Purper-Ouakil e cols., 2011).

Da mesma forma, os estudos de varredura genômica de associação não têm encontrado associações robustas que permaneçam significativas após a correção para múltiplos testes (Neale e cols. 2010; Mick e cols. 2010; Stergiakouli e Thapar, 2010; Purper-Ouakil e cols., 2011). Entretanto, esses estudos têm sugerido novos locos candidatos e, nesse sentido, o gene *CDH13* é um dos resultados mais interessantes, visto que é o único loco com sobreposição entre os diferentes estudos de varredura de associação (Stergiakouli e Thapar, 2010; Purper-Ouakil e cols., 2011). Além disso, esse gene está contido na região cromossômica 16q, que é o sinal de ligação mais consistentemente apontado pelos estudos de varredura de ligação (Zhou e cols. 2008). O gene *CDH13* codifica uma molécula de adesão celular que também é reguladora do crescimento das células neuronais (Stergiakouli e Thapar, 2010). Outros locos candidatos que têm sido sugeridos por esses estudos incluem genes envolvidos em sistemas de comunicação célula-célula, de divisão celular, adesão celular (especialmente via caderinas e integrinas), de migração e plasticidade neuronal (Franke e cols. 2009). Resultados recentes de um estudo que utilizou ferramentas de bioinformática para integrar os resultados das varreduras genômicas indicam que mais de 50% dos principais genes apontados por esses estudos enquadram-se em uma rede de neurodesenvolvimento envolvida no crescimento de neuritos (Poelmans e cols. 2011).

Ainda na busca dos componentes genéticos do TDAH, outras estratégias também têm sido empregadas, como, por exemplo, a investigação do efeito de

variantes raras no transtorno. A hipótese de “Doenças Comuns, Variantes Raras” propõe que uma proporção significativa da susceptibilidade genética às doenças comuns possa ser devido à soma de efeitos independentes de uma série de variantes de baixa frequência, em diferentes genes, cada uma conferindo um risco moderado à doença. Além disso, a hipótese engloba a premissa de que estas variantes serão provavelmente populações-específicas devido aos efeitos populacionais (efeito fundador e deriva genética) (Bodmer e Bonilla, 2008; Schork e cols. 2009). No que diz respeito ao estudo de variantes raras no TDAH, eles ainda são muito escassos e, até o momento, restringiram-se à análise de variantes no gene *DRD4*. Em um primeiro estudo, Grady e cols. (2003) observaram um excesso de variantes raras, dentro de um polimorfismo de número variável de repetições (VNTR) no éxon 3 do gene, nos probandos com TDAH. Posteriormente, ao avaliarem uma amostra de crianças autistas, os autores demonstraram que as variantes raras encontradas na região eram TDAH-específicas (Grady e cols. 2005). Estes achados sugeriram que a heterogeneidade alélica poderia estar contribuindo para a associação do gene *DRD4* com o TDAH. Motivado por esses achados iniciais, um estudo recente em crianças com TDAH da nossa população, ao avaliar a mesma região do gene, também observou um excesso de variantes raras em pacientes com TDAH, quando comparados com controles (Tovo-Rodrigues e cols. 2011). Esses resultados, portanto, sugerem que variantes raras também podem estar atuando na predisposição genética ao TDAH.

Tendo em vista a marcante heterogeneidade dos transtornos mentais, e considerando que fatores genéticos compartilhados estão provavelmente envolvidos na manifestação do TDAH e dos transtornos por uso de substância, nosso grupo tem realizado pesquisas nessa área, investigando a heterogeneidade clínica e genética desses transtornos. Alguns fatores genéticos de susceptibilidade ao TDAH têm se mostrado também importantes na dependência de álcool e no uso de nicotina em indivíduos da nossa população, corroborando o modelo da cascata de desinibição comportamental mencionado anteriormente (Marques e cols. 2006; Contini e cols. 2006; Freire e cols. 2006; Prestes e cols. 2007; Polina e cols. 2009).

Nossa abordagem de estudo tem evidenciado alguns resultados particularmente interessantes, como para os genes do receptor alfa-adrenérgico 2A (*ADRA2A*) e da enzima monoamino oxidase A (*MAOA*). Em relação ao *ADRA2A* observamos uma associação direta de um polimorfismo do gene (C-1291G – rs1800544) com o tabagismo (Prestes e cols. 2007). Posteriormente, um haplótipo contendo o mesmo polimorfismo genético, quando investigado nos pacientes com TDAH, mostrou-se associado com escores mais baixos na dimensão de temperamento evitação de dano e mais elevados em procura de novidades (Cerqueira e cols. 2010), perfil compatível tanto com o uso de substâncias como também com o TDAH (Salgado e cols., 2009). Da mesma forma, para o gene *MAOA*, verificamos uma associação do alelo de baixa atividade do polimorfismo *MAOA-uVNTR* com dependência de álcool (Contini e cols., 2006) e com escores mais baixos de quociente de inteligência (QI) estimado em adultos com TDAH (Contini e cols. 2011, em preparação).

Tendo em conta que os genes *ADRA2A* e *MAOA* apresentam heterogeneidade significativa na meta-análise de estudos de associação do TDAH (Gizer e cols. 2009), nosso conjunto de resultados fornece evidências de que variações no temperamento e na cognição podem explicar o papel aparentemente errático de determinados genes no TDAH. Da mesma forma, são consistentes com a etiologia multifatorial dos transtornos psiquiátricos, onde o efeito de cada gene envolvido, mesmo dentro de uma via de susceptibilidade comum, depende da presença de outros fatores, que interagem entre si na formação de patologias diferentes, como o TDAH e os transtornos por uso de substâncias.

## **1.5 Tratamento**

O tratamento do TDAH exige uma abordagem ampla, englobando aspectos emocionais e sociais, visto que esse transtorno apresenta inúmeros problemas associados em diferentes áreas da vida dos pacientes. Nesse sentido, duas estratégias são possíveis, as intervenções psicossociais e as farmacológicas, sendo que preferencialmente o tratamento deve envolvê-las conjuntamente.

No âmbito das intervenções psicossociais o passo fundamental é educacional, onde os pacientes e familiares devem receber informações claras e precisas sobre o transtorno. Na infância, intervenções no ambiente escolar são muito importantes, e devem ter como foco o desempenho escolar. Psicoterapias individualizadas de apoio são também indicadas, especialmente para abordagem das comorbidades e outros sintomas que comumente acompanham o TDAH, tais como baixa auto-estima, dificuldades de controle de impulsos e capacidades sociais pobres (Rohde e cols. 2000, Louzã Neto, 2010). Em adultos, o foco das intervenções psicoterápicas visa a aceitação da doença, e os problemas mais comumente abordados com esses pacientes são a auto-estima, as relações conjugais, as dificuldades no trabalho e nas atividades acadêmicas. Abordagens que dão ênfase à solução de problemas no trabalho são de grande valia, pois geralmente adultos com TDAH apresentam grandes dificuldades de organizar o seu tempo, dar prioridade a trabalhos em ordem hierárquica e iniciar e terminar as suas tarefas, o que resulta, muitas vezes, em acúmulo de trabalhos inacabados ao longo do dia (Grevet e cols. 2003; Louzã Neto, 2010).

Embora tenha se observado que as abordagens psicoterápicas apresentam resultados positivos no manejo dos pacientes com TDAH, é consenso na literatura que a intervenção farmacológica é essencial para o tratamento (Wigal, 2009; Kaplan e Newcorn, 2011; Castells e cols. 2011). Entre os agentes farmacológicos disponíveis, os estimulantes são a medicação de primeira escolha e inúmeros ensaios clínicos têm demonstrado a eficácia desses agentes na redução dos sintomas nucleares do TDAH, tanto em crianças e adolescentes quanto em adultos. Além disso, tem sido observado que os estimulantes também apresentam efeitos positivos em outros aspectos relacionados com o transtorno, tais como na produtividade acadêmica, nos relacionamentos familiares e sociais e em comportamentos disruptivos (Kaplan e Newcorn, 2011). A primeira descrição científica da eficácia dos estimulantes no tratamento de crianças com problemas comportamentais (que mais tarde seriam reconhecidos como sintomas do TDAH) data de 1937 (Bradley, 1937).

Dois agentes estimulantes estão disponíveis para o tratamento do TDAH, as anfetaminas (AMP) e o metilfenidato (MPH), que podem ser encontrados em

diferentes formulações. No Brasil, até muito recentemente o único estimulante aprovado era o MPH, que atualmente está disponível nas formulações de liberação imediata (Ritalina®) e de liberação prolongada (Concerta® e Ritalina LA®). No início deste ano, a Shire farmacêutica lançou no mercado o primeiro pró-fármaco de ação prolongada cuja substância ativa é a d-anfetamina (Vevanse®). Embora as várias opções disponíveis pareçam apresentar a mesma eficácia na redução dos sintomas, as formulações de liberação prolongada (tanto de MPH quanto de AMP) podem ter efeitos benéficos também na aderência ao tratamento, já que reduzem o número de vezes que o paciente precisa tomar a medicação (Kaplan e Newcorn, 2011).

Os estudos têm demonstrado que 65% a 75% dos pacientes com TDAH respondem ao tratamento com estimulantes (Wigal, 2009; Kooij e cols. 2010; Kaplan e Newcorn, 2011). Para os pacientes que não respondem, ou não toleram os estimulantes, a atomoxetina é o fármaco de segunda escolha, seguida por outros medicamentos não estimulantes, tais como antidepressivos e agentes adrenérgicos (clonidina e guanfacina) (Wigal, 2009; Kooij e cols. 2010; Kaplan e Newcorn, 2011). O mecanismo de ação da atomoxetina, assim como dos estimulantes em geral, parece envolver a potencialização da transmissão catecolaminérgica no córtex pré-frontal (Kaplan e Newcorn, 2011).

Embora o tratamento farmacológico seja bem tolerado pelos pacientes, é sempre importante lembrar que todos os fármacos produzem efeitos adversos. No caso dos estimulantes, os efeitos adversos mais comuns incluem insônia, perda de apetite, dores de cabeça e irritabilidade. Com menos frequência, os pacientes também podem apresentar náusea, dores abdominais, palpitações e tonturas (Kooij e cols. 2010; Kaplan e Newcorn, 2011).

### **1.5.1 Tratamento Farmacológico em Adultos**

A medicação de primeira escolha para o tratamento de adultos com TDAH é o MPH e três estudos de meta-análise dos ensaios clínicos com esse medicamento já foram realizados. Em conjunto, esses estudos consistentemente

demonstram um efeito significativo do tratamento com MPH na redução dos sintomas do TDAH em adultos (Faraone e cols. 2004; Koesters e cols. 2009; Castells e cols. 2011).

No entanto, também tem sido observada uma grande variabilidade no tamanho de efeito do MPH entre os diferentes ensaios clínicos realizados (Faraone e cols. 2004; Koesters e cols. 2009; Castells e cols. 2011). O tamanho de efeito representa uma medida estatística generalizada que permite comparar quantitativamente a eficácia do tratamento farmacológico entre diferentes estudos, mesmo que eles utilizem ferramentas diferentes de avaliação da resposta clínica dos pacientes. Um cálculo típico de tamanho de efeito utilizado nesses estudos (Cohen's *d*) indica que um valor de 0,2 representa um tamanho de efeito pequeno, de 0,5 o tamanho de efeito é considerado moderado e valores acima de 0,8 representam tamanhos de efeito grandes (Wigal, 2009). Nesse contexto, a meta-análise de Faraone e cols. (2004) indicou um tamanho de efeito grande (0,9); já os resultados de Koesters e cols. (2009) indicaram um tamanho de efeito significativamente menor (0,42). A última meta-análise realizada indicou um tamanho de efeito moderado (0,57) (Castells e cols. 2011).

Essa variabilidade observada nos tamanhos de efeito entre as três meta-análises conduzidas até o momento parece refletir diferenças metodológicas importantes entre os ensaios clínicos de resposta ao MPH. Na meta-análise de Faraone e cols. (2004), por exemplo, seis estudos foram incluídos e os tamanhos de efeito variavam de 0,24 a 2,3. Os autores observaram que os tamanhos de efeito maiores estavam significativamente associados com o uso de doses maiores (maiores ou igual a 0,9 mg/kg/dia) e com a avaliação realizada pelo médico (quando comparada com a auto-avaliação). No entanto, na meta-análise de Koesters e cols. (2009) não foram detectadas influências significativas desses fatores (dose e avaliador) no tamanho de efeito. Por outro lado, esse estudo observou que o MPH não apresenta efeitos em um subgrupo de pacientes com TUSP. Com o intuito de melhor esclarecer os fatores que poderiam estar influenciando os resultados observados nos ensaios clínicos, uma terceira meta-análise foi realizada recentemente (Castells e cols. 2011). Nesse estudo, foram incluídos dados de 18 ensaios clínicos e os resultados indicaram que a eficácia do

MPH no tratamento dos pacientes com TDAH é dose-dependente, ou seja, tamanhos de efeito maiores são obtidos com doses maiores. Além disso, sugerem que a eficácia do MPH poderia ser menor em pacientes com TUSP.

A presença de comorbidades é extremamente significativa no TDAH em adultos. No que diz respeito ao tratamento nesses casos, a abordagem vai depender do transtorno associado e da avaliação médica. No caso da existência de um quadro de depressão maior, pode-se iniciar o tratamento simultaneamente com o MPH e antidepressivos, ou abordar primeiramente a depressão. Já em pacientes com transtorno de humor bipolar a indicação é iniciar o tratamento com um estabilizador de humor e posteriormente associar o MPH (Grevet e Rohde, 2005). Uma supervisão maior é requerida no tratamento de pacientes comórbidos com TUSP, devido ao risco de abuso. Nesses casos, a atomoxetina, os antidepressivos e o MPH de liberação prolongada, que parecem exibir um risco menor de abuso, são recomendados para indivíduos com história muito recente (menos de três meses) de abuso de substâncias; depois desse período, qualquer medicação pode ser usada, inclusive MPH de ação imediata (Grevet e Rohde, 2005; Szobot e Romano, 2007).

Outro aspecto importante do tratamento dos pacientes com TDAH está relacionado com a aderência e continuidade do tratamento farmacológico (Wigal, 2009). Nesse sentido, um estudo realizado pelo nosso grupo investigou diversas variáveis demográficas e clínicas que poderiam estar associadas ao abandono do uso de MPH (Victor e cols. 2009). Os resultados indicaram que 22,5% (N=69) dos pacientes incluídos no estudo abandonaram o tratamento antes de iniciar o uso de MPH (durante ou após a estabilização das comorbidades) e 26,6% (N=63) abandonaram o uso do medicamento durante o período do estudo. O abandono do tratamento durante a estabilização das comorbidades foi associado com a presença dos transtornos bipolar e obsessivo-compulsivo, abuso de álcool e TOD. Já os pacientes que iniciaram e abandonaram o tratamento durante o período do estudo apresentaram uma maior prevalência de fobia social. Fatores sócio-demográficos e a gravidade do transtorno não foram associados aos desfechos estudados. Os achados deste estudo sugerem, portanto, que as comorbidades

desempenham um papel importante na aderência e continuidade do tratamento do TDAH em adultos.

### **1.5.2 Mecanismo de Ação do MPH**

O mecanismo de ação do MPH não está completamente esclarecido, mas assume-se que seus efeitos terapêuticos estejam relacionados com a transmissão catecolaminérgica (Wilens, 2008; Arnsten e Pliszka, 2011). Inicialmente, as investigações da ação do MPH em pacientes com TDAH estavam focadas nos seus efeitos sobre a transmissão dopaminérgica (Solanto, 2002; Volkow e cols. 2005). De acordo com essas investigações, os efeitos terapêuticos do MPH estavam relacionados com o bloqueio das proteínas transportadoras de dopamina no estriado. Desta forma, haveria um aumento da disponibilidade de dopamina na fenda sináptica, o que resultaria na amplificação da sinalização dopaminérgica (Volkow e cols. 2005). De fato, estudos de neuroimagem têm demonstrado uma redução na disponibilidade dos transportadores de dopamina em crianças e adultos com TDAH após a administração de MPH (Wilens, 2008).

De acordo com o modelo de ação dopaminérgica, o MPH aumentaria a concentração extracelular de dopamina através de vários mecanismos, incluindo o bloqueio dos transportadores de dopamina, a desinibição dos auto-receptores de dopamina do tipo D2 nos neurônios pré-sinápticos, e a ativação dos receptores de dopamina do tipo D1 nos neurônios pós-sinápticos. Em conjunto, essa ação resultaria na amplificação da atividade dopaminérgica, levando a melhoras nos déficits atencionais, no funcionamento cognitivo e na hiperatividade motora (Wilens, 2008).

No entanto, as pesquisas iniciais da ação do MPH foram limitadas, em parte, pelo fato de que os estudos de neuroimagem utilizados permitiam a visualização dos receptores de dopamina no estriado, mas não eram capazes de visualizar mudanças nas concentrações de noradrenalina e dopamina no córtex pré-frontal (Arnsten e Pliszka, 2011). Atualmente, diversas evidências indicam que, de fato, os efeitos terapêuticos do MPH estão mais relacionados com sua



ação na transmissão catecolaminérgica no córtex pré-frontal do que apenas com sua ação na transmissão estriatal dopaminérgica (Berridge e cols. 2006; Arnsten, 2009; Arnsten e Pliszka, 2011). Berridge e cols. (2006), em um estudo com ratos, demonstraram que a administração de MPH em doses terapêuticas significativamente aumenta os níveis de dopamina e noradrenalina no córtex pré-frontal. Nesse contexto, o MPH exerceria seus efeitos terapêuticos através da ação conjunta da dopamina, via receptores do tipo D1, e da noradrenalina, via receptores alfa-adrenérgicos 2A (Arnsten, 2009; Arnsten e Pliszka, 2011).

Recentemente, dados de um estudo de neuroimagem demonstraram pela primeira vez que, em humanos, a administração de doses terapêuticas de MPH também bloqueia os transportadores de noradrenalina. Isso sugere, portanto, que os efeitos do MPH no TDAH podem ser também mediados pela inibição dos transportadores de noradrenalina, além da já bem constatada inibição dos transportadores de dopamina (Hannestad e cols. 2010).

## **1.6 Farmacogenética do MPH**

Vários aspectos que foram discutidos até aqui evidenciam claramente que, apesar da existência de um pequeno grupo de medicamentos altamente eficazes no tratamento do TDAH, em especial os estimulantes, existe também uma grande variabilidade na resposta dos pacientes ao tratamento. Além de uma porcentagem significativa de pacientes que não respondem positivamente aos estimulantes, observa-se ainda uma variabilidade na dosagem, duração do efeito e tolerabilidade ao medicamento, mesmo entre os indivíduos que obtêm uma resposta favorável. Além disso, sabe-se que uma porção considerável dos pacientes abandona o tratamento farmacológico, apesar da persistência dos sintomas (Froehlich e cols. 2010; Kieling e cols. 2010; Wallis, 2010 Polanczyk e cols. 2010).

O efeito do MPH, como de qualquer outro fármaco, é um fenômeno complexo, multicausal, e vários fatores podem influenciar a resposta e a continuidade dos pacientes no tratamento. Alguns fatores inerentes do tratamento

com qualquer medicamento, como o efeito placebo, a dose empregada e os efeitos adversos, são certamente aspectos relevantes na resposta ao MPH. Além disso, características clínicas específicas dos pacientes com TDAH, como a presença marcante de comorbidades associadas, provavelmente também influenciam a aderência e a resposta ao tratamento com MPH (Victor e cols. 2009; Chazan e cols. 2011). Por outro lado, sabe-se também que variações genéticas inter-individuais estão envolvidas no modo com que os pacientes respondem ao tratamento farmacológico (Weinshilboum, 2003). Portanto, é extremamente plausível que parte da variabilidade observada na resposta ao tratamento com o MPH seja devida a fatores genéticos.

Nesse sentido, abordagens farmacogenéticas podem ajudar a desvendar a heterogeneidade observada na resposta clínica dos pacientes ao tratamento farmacológico, identificando variações genéticas relacionadas com a melhora dos sintomas, relações dose-efeito e efeitos adversos. Por fim, a detecção de diferenças genéticas individuais na resposta ao MPH poderia levar a novas estratégias para o tratamento de pacientes com TDAH (Polanczyk e cols. 2010).

Os estudos farmacogenéticos do MPH em pacientes com TDAH têm partido do princípio de que os genes candidatos como mediadores da resposta ao tratamento seriam justamente aqueles relacionados aos sítios de ação direta do MPH, às rotas metabólicas dos neurotransmissores ou aos receptores para dopamina ou noradrenalina. No entanto, até o momento, o número de investigações farmacogenéticas ainda é relativamente pequeno, especialmente em adultos. Quatro revisões desses estudos foram publicadas recentemente e, de forma geral, os achados iniciais de genes possivelmente envolvidos na resposta ao MPH parecem refletir a complexidade etiológica do transtorno, onde possivelmente vários genes de pequeno efeito estariam envolvidos (Froehlich e cols. 2010; Kieling e cols. 2010; Wallis, 2010 Polanczyk e cols. 2010). Na última revisão publicada foram incluídos 31 estudos de resposta ao MPH, todos realizados em crianças. Em adultos, existem apenas quatro publicações, sendo duas de autoria de outros grupos (Mick e cols. 2006; Kooij e cols. 2008) e duas fazem parte dessa tese (Contini e cols. 2010, 2011, capítulos 3 e 4).

Diversas evidências, provenientes de estudos neurobiológicos e do mecanismo de ação do MPH, fizeram do gene *DAT1* um dos mais estudados na mediação da resposta ao tratamento em pacientes com TDAH. Nesse gene, o principal polimorfismo investigado é um VNTR de 40 pares de base (pb) na região 3' não-traduzida, que pode estar repetido de 3 a 11 vezes, sendo que os alelos mais frequentes apresentam 9 ou 10 repetições. A hipótese inicial dos estudos farmacogenéticos em crianças associa a homozigose para o alelo de 10 repetições (10R) com uma pior resposta ao tratamento (Winsberg e Commings, 1999) e alguns estudos posteriores confirmaram essa associação. No entanto, os achados farmacogenéticos para esse polimorfismo são ainda bastante confusos e de difícil integração, pois também existem diversos relatos de ausência de efeito, efeitos contrários, além de uma série de associações do alelo de 9 repetições com a resposta ao tratamento (Froehlich e cols. 2010; Kieling e cols. 2010; Wallis, 2010; Polanczyk e cols. 2010).

Em adultos, dois estudos prévios investigaram esse mesmo polimorfismo no gene *DAT1*. Mick e cols. (2006), em uma amostra de 106 indivíduos, não foram capazes de detectar nenhum efeito genético na resposta ao tratamento ou nos efeitos adversos relacionados. Já um segundo estudo, que avaliou 42 adultos, observou que indivíduos portadores do genótipo 9R/10R apresentaram uma resposta mais favorável ao tratamento, quando comparados com homozigotos para o alelo de 10R (Kooij e cols. 2008).

Essas discrepâncias de resultados observados para o gene *DAT1*, tanto em crianças quanto em adultos, podem ser em parte explicadas por diversos aspectos metodológicos que variam entre os estudos, como o tamanho amostral, as doses empregadas e a duração do tratamento, além da falta de avaliação e o papel de variáveis confundidoras, como a presença de comorbidade (Froehlich e cols. 2010; Kieling e cols. 2010; Polanczyk e cols. 2010). Além disso, também é possível que o polimorfismo investigado, nestes casos o VNTR de 40pb na região 3' do gene, não esteja refletindo uma alteração funcional na expressão da proteína. Desta forma, padrões diferentes de desequilíbrio de ligação entre as diferentes populações também poderiam ajudar a explicar os achados discrepantes (Genro e cols. 2008).

Interessantemente, alguns estudos têm demonstrado, através de técnicas de neuroimagem, que a densidade de proteínas transportadoras de dopamina no estriado está relacionada com a resposta de pacientes adultos ao MPH (Krause e cols. 2005; la Fougère e cols. 2006). Mais especificamente, esses estudos têm observado que os pacientes que não respondem positivamente ao tratamento apresentam uma densidade diminuída de transportadores de dopamina, quando comparados com os pacientes que respondem ao tratamento. Isso nos sugere, portanto, que variações genéticas ainda não investigadas no gene *DAT1*, e que apresentam efeitos funcionais na expressão do gene, podem estar influenciando a resposta dos pacientes com TDAH ao tratamento com MPH.

Ainda no sistema dopaminérgico, o segundo polimorfismo mais avaliado nos estudos de farmacogenética, em crianças, é o VNTR de 48pb do éxon III do gene *DRD4*. No entanto, também aqui os resultados são contraditórios. Enquanto alguns estudos sugeriram uma associação entre o alelo de 7 repetições e uma melhor resposta ao MPH, outros encontraram associação entre o mesmo alelo e uma pior resposta ao tratamento. Além disto, resultados negativos e envolvendo outros alelos do polimorfismo também já foram relatados (Froehlich e cols. 2010; Kieling e cols. 2010; Polanczyk e cols. 2010). Em adultos, apenas o estudo de Kooij e cols. (2008) investigou o gene *DRD4*, e nenhum efeito na resposta ao MPH foi observado.

Outros genes do sistema dopaminérgico, além dos citados acima, já foram investigados em crianças e os resultados mais promissores apontam para o gene da enzima catecol-O-metiltransferase (*COMT*), visto que os três estudos farmacogenéticos que avaliaram esse gene detectaram efeitos na resposta dos pacientes ao tratamento (Kereszturi e cols. 2008; Cheon e cols. 2008, Salatino-Oliveira e cols. 2011). Essa enzima desempenha uma função importante na regulação dos níveis extracelulares de dopamina no córtex pré-frontal, região sabidamente envolvida no mecanismo de ação do MPH.

Genes em outros sistemas de neurotransmissão também já foram investigados e, entre eles, destacam-se os genes da proteína transportadora de noradrenalina (*SLC6A2/ NET1*) e o gene *ADRA2A*. Resultados consistentes de associações entre polimorfismos nesses genes e a resposta ao tratamento em

crianças com TDAH têm sido relatados, reforçando a importância da transmissão noradrenérgica no mecanismo de ação do MPH (Froehlich e cols. 2010; Kieling e cols. 2010; Polanczyk e cols. 2010). Em adultos, apenas o gene *NET1* foi investigado, e os resultados não evidenciaram nenhum efeito na resposta ao tratamento (Kooij e cols. 2008).

Além dos sistemas dopaminérgico e noradrenérgico, existem ainda relatos de efeitos do gene *5-HTT* (Seeger e cols. 2001), *SNAP25* (McGough e cols. 2006), *MAOA* (Guimarães e cols. 2009) e do gene da enzima triptofano hidroxilase 2 (*TPH2*) (Manor e cols. 2008) na resposta ao tratamento com MPH em crianças. Polimorfismos nos genes dos receptores de dopamina D2 (*DRD2*) e D5 (*DRD5*), da enzima dopamina-beta hidroxilase (*DBH*), dos receptores de serotonina 2A (*HTR2A*) e 1B (*HTR1B*) e do receptor nicotínico subunidade alfa-4 neuronal (*CHRNA4*), também já foram estudados, embora nenhum deles tenha sido associado com a resposta ao MPH (Polanczyk e cols. 2010). Com relação aos genes de metabolização, até o momento, apenas um estudo investigou o efeito de um polimorfismo funcional no gene *CES1* (Gly143Glu) em crianças tratadas com MPH (Nemoda e cols. 2009). Esse gene codifica a enzima carboxil-esterase 1A1, que é responsável pela hidrólise do MPH para ácido carboxílico (ácido ritalínico), que é um composto inativo (Sun e cols. 2004). Os resultados indicaram que os pacientes portadores do alelo Glu, o qual estaria associado com uma atividade enzimática reduzida, necessitaram de doses menores de MPH.

Do mesmo modo que tem sido observado nas varreduras genômicas de associação com o TDAH, o único estudo que investigou a resposta ao tratamento com MPH sob essa perspectiva também não foi capaz de detectar alguma associação que preenchesse os critérios de significância para varreduras genômicas (Mick e cols. 2008). No entanto, esse estudo evidencia um aspecto relevante da farmacogenética do TDAH, o de que não existem genes de grande efeito influenciando a resposta ao MPH. Portanto, amostras significativamente grandes são necessárias para a detecção dos genes associados com a resposta ao tratamento. Nesse contexto, uma estratégia possível para alcançar os tamanhos amostrais adequados é o desenvolvimento de estudos colaborativos agregando amostras de diversos centros.

Polanczyk e cols. (2008) investigaram o impacto de diversos aspectos metodológicos e clínicos de nove amostras diferentes de farmacogenética do TDAH, provenientes de quatro continentes, que poderiam influenciar a variabilidade de resposta ao tratamento com MPH. Os resultados estimaram um tamanho de efeito do MPH no tratamento de 1,32, quando as nove amostras foram consideradas conjuntamente. No entanto, também foi detectada a presença de heterogeneidade entre as amostras na variação dos sintomas de TDAH após o tratamento. As análises posteriores indicaram que dos fatores que variam entre as diferentes amostras, incluindo o continente, a escala de avaliação dos sintomas, o avaliador e o tamanho amostral, apenas o desenho do estudo (estudo aberto não-controlado versus estudo randomizado controlado) estava significativamente associado com a heterogeneidade dos resultados. Em um segundo estágio, as amostras foram agregadas e o efeito de fatores individuais, como o QI, a idade e o subtipo de TDAH, entre outros, foram avaliados com relação às mudanças nos sintomas do transtorno após o tratamento. Os resultados dessa etapa do estudo indicaram que a idade, a presença de TOD e os escores de gravidade pré-tratamento estavam significativamente associados com a porcentagem de mudanças nos sintomas após o tratamento.

Em conjunto, esses resultados indicam que estudos colaborativos são possíveis, visto que nenhuma variável fixa, como, por exemplo, o continente onde o estudo é conduzido, está relacionada com a resposta ao medicamento. No entanto, o desenho do estudo e variáveis clínicas individuais dos pacientes (como a idade, as comorbidades e a gravidade dos sintomas) devem ser levados em consideração na análise dos resultados, especialmente em estudos de meta-análise.

## Capítulo II

---

### JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

## Justificativa

Como já foi mencionado, o TDAH é um transtorno suficientemente prevalente e grave para justificar a busca por um tratamento adequado. Até o momento, a maioria dos pacientes é tratada com MPH, sendo que muitas vezes os resultados satisfatórios só são obtidos após inúmeros ajustes na dose. Ainda assim, o sucesso do tratamento, especialmente a longo prazo, é limitado a uma fração dos pacientes. A opção por outro fármaco geralmente só se dá após uma tentativa terapêutica com resultados insatisfatórios com o MPH, o que muitas vezes causa inúmeras frustrações e desfechos negativos na vida dos pacientes.

Sendo assim, é necessário persistir na busca por fatores relacionados com a resposta terapêutica. Nesse contexto, a farmacogenética é uma ferramenta muito importante, visto que variações genéticas estão sabidamente envolvidas na variabilidade inter-individual da resposta ao tratamento. A identificação de preditores genéticos associados à resposta ao MPH pode subsidiar novos estudos clínicos, promovendo não somente a otimização do tratamento, mas também a descoberta de novos alvos para o desenvolvimento de outros fármacos e, assim, aumentar as possibilidades de tratamento para os pacientes que não respondem ou não toleram o MPH.

Todavia, os resultados farmacogenéticos obtidos até então evidenciam a enorme dificuldade de integrar e entender o papel de variantes genéticas na resposta ao MPH. De fato, para alcançar esse objetivo é fundamental esclarecer quais mecanismos neurobiológicos são influenciados por essas variantes. Assim, é especialmente interessante verificar a importância dos mesmos genes em outros transtornos psiquiátricos. Destacam-se, nesse sentido, os transtornos por uso de substâncias, que provavelmente compartilham uma via de susceptibilidade genética com o TDAH. Essa abordagem tem sido utilizada pelo nosso grupo na tentativa de melhor compreender o efeito dos genes em fenótipos comportamentais, o que tem gerado alguns resultados relevantes como, por exemplo, os achados para os genes *ADRA2A* e *MAOA*.



## **Objetivo Geral**

O objetivo principal deste trabalho é avaliar a influência de polimorfismos genéticos na resposta clínica ao MPH em adultos com TDAH, buscando compreender também o papel de variáveis mediadoras e confundidoras, além da influência desses polimorfismos em outros fenótipos relacionados.

## **Objetivos específicos**

- Investigar a associação entre 17 polimorfismos nos genes *DAT1*, *ADRA2A*, *5-HTT*, *HTR1B*, *TPH2*, *DBH*, *DRD4*, *COMT* e *SNAP25* e a resposta ao tratamento com MPH em adultos com TDAH.

- Investigar a associação entre polimorfismos no gene *HTR1B* e a dependência de álcool.

**Capítulo III**

---

**RESPONSE TO METHYLPHENIDATE IS NOT INFLUENCED BY DAT1  
POLYMORPHISMS IN A SAMPLE OF BRAZILIAN ADULT  
PATIENTS WITH ADHD**

**Journal of Neural Transmission (2010): 117: 269-276**

# Response to methylphenidate is not influenced by DAT1 polymorphisms in a sample of Brazilian adult patients with ADHD

Verônica Contini · Marcelo M. Victor · Francine Z. C. Marques · Guilherme P. Bertuzzi · Carlos A. I. Salgado · Katiane L. Silva · Nyvia O. Sousa · Eugenio H. Grevet · Paulo Belmonte-de-Abreu · Claiton H. D. Bau

Received: 6 August 2009 / Accepted: 10 December 2009 / Published online: 5 January 2010  
© Springer-Verlag 2009

**Abstract** Several lines of evidence suggest a relevant role for the dopamine transporter (DAT1) gene not only as a susceptibility factor for attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), but also as a predictor of individual methylphenidate (MPH) response. Pharmacogenetic studies of MPH response in ADHD have mainly focused on the 40-bp variable number of tandem repeats (VNTR) in the 3' untranslated region (3'-UTR) of DAT1. Most studies were performed in samples of children and conflicting findings were obtained. Only two studies have assessed 3'-VNTR in samples of adults—one with positive and the other with negative findings. In the present study, we investigate three potentially relevant polymorphisms in DAT1 gene (−839 C > T; Int8 VNTR and 3'-VNTR), and their possible role in therapeutic response to MPH treatment in a sample of 171 Brazilian adults with ADHD. The diagnostic

procedures followed the DSM-IV criteria and the outcome measures were the scales Swanson, Nolan, and Pelham Rating scale version IV and the Clinical Global Impression-Severity Scale, applied at the beginning and after the 30th day of treatment. Drug response was assessed by both categorical and dimensional approaches. There was no effect of any DAT1 polymorphisms or haplotypes on MPH response. This is the second report demonstrating absence of differences in MPH response according to DAT1 genotypes in adults with ADHD. Although DAT protein is crucial for the effect of MPH, genetic variations in DAT1 gene probably do not have a significant clinical role in this sample of adults with ADHD.

**Keywords** Attention-deficit hyperactivity disorder · Pharmacogenetics · DAT1 gene · Methylphenidate · Dopamine transporter

V. Contini · G. P. Bertuzzi · C. H. D. Bau (✉)  
Departament of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal:15053, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil  
e-mail: claiton.bau@ufrgs.br

M. M. Victor · C. A. I. Salgado · K. L. Silva ·  
N. O. Sousa · E. H. Grevet · P. Belmonte-de-Abreu ·  
C. H. D. Bau  
Adult ADHD Outpatient Clinic, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

F. Z. C. Marques  
Basic and Clinical Genomics Laboratory, School of Medical Sciences and Bosch Institute, The University of Sydney, Sydney, NSW, Australia

P. Belmonte-de-Abreu  
Departament of Psychiatry, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

## Introduction

Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) is a heterogeneous and highly heritable disorder manifesting itself in symptoms of inattention and/or hyperactivity/impulsivity that arise during childhood, frequently persistent across development, and result in impairment in multiple domains of adaptive functioning (Spencer et al. 2007). The prevalence of ADHD is around 5% in children (Polanczyk et al. 2007) and 2.5% in adults (Simon et al. 2009).

Pharmacotherapy is central in ADHD treatment, and the main pharmacological drug prescribed is methylphenidate hydrochloride (MPH; Conners 2002). The therapeutically effective functions of MPH in the reduction of ADHD symptoms is not completely understood, but has been attributed to its ability to bind to the dopamine transporters

(DATs) in the presynaptic cell membrane and block the re-uptake of dopamine (DA), which increases levels of synaptic and extracellular DA (Solanto 1998; Seeman and Madras 1998; Krause et al. 2000).

DAT protein is encoded by *DAT1* gene (*SLC6A3*), located in chromosome 5p15.3 (Giros et al. 1992; Vandenberg et al. 1992). To date, almost all *DAT1* pharmacogenetic studies of MPH have focused exclusively on a single 40-bp variable number of tandem repeats (VNTR) in the 3' untranslated region (3'-UTR) of the gene, with 3–11 repetitions (Vandenberg et al. 1992), probably because this is the most extensively studied marker in the susceptibility to ADHD (Maher et al. 2002; Purper-Ouakil et al. 2005; Faraone et al. 2005; Li et al. 2006). A meta-analysis including samples of children showed a significant association between the 10R–10R genotype and low rates of MPH response (Purper-Ouakil et al. 2008), but the putative effect is very small and still inconsistent. Only two studies assessed the 3'-VNTR in samples of adults; one with positive (Kooij et al. 2008) and the other with negative findings (Mick et al. 2006).

More recently, other regions of *DAT1* gene have also been included in ADHD genetic association studies. Some findings evidenced an association with a haplotype comprising the 3'-VNTR and a VNTR in intron 8 (Int8 VNTR; Brookes et al. 2006; Asherson et al. 2007; Franke et al. 2008). Other studies have also suggested a significant role for polymorphisms in the promoter region of *DAT1* gene in ADHD susceptibility (Genro et al. 2008; Brookes et al. 2008; Xu et al. 2009; Doyle et al. 2009).

Therefore, despite the fact that *DAT1* is a very important gene in ADHD, there are no pharmacogenetic studies focusing in gene regions other than 3'-UTR. In the present study, we investigate three potentially relevant polymorphisms in different regions of *DAT1* gene (–839 C > T; Int8 VNTR and 3'-VNTR), and their possible role in the therapeutic response of adults to MPH treatment.

## Materials and methods

### Subjects

The sample comprised 171 adults with ADHD from the ADHD Outpatient Program at the Hospital de Clinicas de Porto Alegre. The inclusion criteria were (a) native Brazilian of European descent; (b) age 18 years or above; (c) fulfillment of DSM-IV diagnostic criteria for ADHD (American Psychiatric Association 1994) both currently and during childhood; (d) drug naïve for MPH; (e) eligibility to immediate-release methylphenidate (IR-MPH) treatment after the treatment of comorbidities. Exclusion criteria were the presence of (a) clinical contra-indication

to IR-MPH; (b) any significant neurological disease (e.g., delirium, dementia, epilepsy, head trauma, multiple sclerosis); (c) current or past history of psychosis; and (d) intelligence quotient (IQ) < 70. The project was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Institutional Review Board (IRB) of the hospital (IRB #00000921). All patients signed an informed consent. This protocol is detailedly described in Victor et al. (2009).

The diagnostic procedures for ADHD and oppositional defiant disorder (ODD) followed the DSM-IV criteria using the adaptation to adults (Grevet et al. 2005) of K-SADS-E (Portuguese version; Mercadante et al. 1995). K-SADS-E is a semi-structured interview for children and adolescents aged 6–18 which assesses current episodes and the severest episode in the past (lifetime) DSM-IV psychiatric disorders in children (Ambrosini 2000). The Axis I psychiatric comorbidities were evaluated using the SCID-IV-R structured interview system (First et al. 1998). The diagnoses of conduct and antisocial personality disorder were obtained using the appropriate sections of the Mini-International Neuropsychiatric Interview (MINI; Sheehan et al. 1998). A detailed description of the severity and comorbidity profiles of this sample is given in Grevet et al. (2006) and Fischer et al. (2007). The frequencies of the most common comorbidities are outlined in Table 1. The estimated IQ scores were obtained from the vocabulary and block design subtests of the Wechsler Adult Intelligence Scale—Revised (WAIS-R; Wechsler 1981) administered by a trained psychologist.

### Pharmacological intervention and drug response

All current clinically significant comorbid disorders (excluding tobacco dependence, anti-social personality disorder, and ODD) were initially treated according to current guidelines. After the clinical stabilization of comorbidities, i.e., current comorbidities that were no longer clinically relevant, a clinical evaluation was performed to verify the persistence of ADHD symptoms, and then IR-MPH was initiated. The most frequent comedication were antidepressants and mood stabilizers with no significant evidence for pharmacointeractions.

Patients were treated with weekly increase in IR-MPH dose until symptom control or occurrence of limiting adverse effects. No subjects were treated under the dosage of 0.3 mg/kg/day, which was already proved to be therapeutic (Rösler et al. 2009). IR-MPH was administered twice or thrice a day according to the patient's daily activities. Patients were usually reassessed once or twice in a period of 30 days after initiation and titration of IR-MPH. The final measurements were taken after the 30th day of the treatment.

**Table 1** Demographic and clinical characteristics of the sample according to MPH response

Characteristic	Total <i>N</i> = 171	Responders <i>N</i> = 136	Non-responders <i>N</i> = 35	<i>P</i> *
Age, median ( $\pm$ SD)	35 ( $\pm$ 11)	34 ( $\pm$ 10)	38 ( $\pm$ 13)	0.04
Sex: male (%)	89 (52%)	74 (54%)	15 (43%)	0.15
IQ, median ( $\pm$ SD)	101.5 (9.4)	102.3 (9.7)	98.9 (8.3)	0.07
ADHD subtype <i>N</i> (%)				0.27
Combined	106 (62%)	87 (64.4%)	19 (51.4%)	
Inattentive	60 (35.1%)	45 (33.3%)	15 (42.9%)	
Hyperactive	5 (2.9%)	3 (2.2%)	2 (5.7%)	
Lifetime comorbid conditions <i>N</i> (%)				
Any bipolar disorder	25 (14.6%)	19 (14%)	6 (17.1%)	0.64
Major depression	65 (38%)	52 (38.2%)	13 (37.1%)	0.91
Generalized anxiety disorder (GAD)	35 (20.5%)	26 (19.1%)	9 (25.7%)	0.39
ODD	67 (39.6%)	54 (40%)	13 (38.2%)	0.85
Alcohol dependence	10 (5.8%)	8 (5.9%)	2 (5.7%)	0.97
Nicotine use	68 (40%)	59 (43.4%)	9 (25.7%)	0.06
SNAP-IV baseline scores, median ( $\pm$ SD)				
Total	1.68 (0.51)	1.74 (0.50)	1.45 (0.43)	0.002
Inattentive	1.88 (0.55)	1.93 (0.53)	1.69 (0.59)	0.02
Hyperactivity-impulsivity	1.48 (0.71)	1.56 (0.70)	1.19 (0.68)	0.007
Oppositional	0.85 (0.59)	0.85 (0.62)	0.82 (0.49)	0.78
CGI-S baseline scores, median ( $\pm$ SD)	4.56 (0.73)	4.62 (0.74)	4.34 (0.64)	0.05
Concomitant use of medication <i>N</i> (%)	45 (26.3)	27 (19.9%)	18 (51.4%)	<0.001
MPH dose, mg/kg median ( $\pm$ SD)				
At baseline	0.15 (0.07)	0.15 (0.07)	0.15 (0.07)	0.71
At 1 mo	0.48 (0.17)	0.47 (0.17)	0.48 (0.15)	0.75
SERS baseline score <sup>a</sup>	42.72 (26.92)	39.63 (25.78)	53.48 (28.60)	0.03

*SD* standard deviation, *IQ* intelligence quotient, *ADHD* attention-deficit hyperactivity disorder, *SNAP-IV* Swanson, Nolan, and Pelham Scale version IV, *CGI-S* Clinical Global Impression-Severity Scale, *MPH* methylphenidate hydrochloride, *SERS* Barkley Side Effect Rating Scale

<sup>a</sup> Total, *N* = 103; responders, *N* = 80; non-responders, *N* = 23

\* Responders and non-responders were compared using the chi-square test (categorical variables) or the ANOVA test (continuous variables)

The outcome measures of MPH treatment were the Portuguese version of the Swanson, Nolan, and Pelham Rating Scale version IV (SNAP-IV; Swanson 1992) and the Clinical Global Impression-Severity Scale (CGI-S; Guy 1976). SNAP-IV includes items from the DSM-IV criteria for ADHD and ODD. The scale is based on 0–3 ratings: not at all, just a little, quite a bit, and very much. SNAP-IV scores are computed by summing the scores in items from each dimension (inattention, hyperactivity/impulsivity, and oppositional defiant), divided by the number of items in the dimension. CGI-S is a clinician-rated assessment in which scores vary from 1 (no symptoms) to 7 (extremely severe symptoms). The side effects of stimulants were assessed with the Barkley Side Effect Rating Scale (SERS; Barkley 1990). SERS is based on 0 (none) to 9 (extreme) scores of side effects associated to MPH. These scores are computed by summing the scores of all items. All scales were applied at the beginning (baseline levels) and after the 30th day of

the treatment and all procedures were performed while blind to the results of genotyping.

Drug response was assessed by both categorical and dimensional approaches. The a priori categorical definition of response was a 30% or greater symptom reduction in SNAP-IV and a CGI-S score of two points or less. The dimensional evaluation of drug response was measured by the variation in SNAP-IV scores.

#### Laboratory methods

The DNA was extracted from whole blood by an adaptation of Lahiri and Nurnberger (1991). The polymorphisms *DAT1* 3'-VNTR (rs28363170) and the *Int8* VNTR were amplified using the polymerase chain reaction (PCR) conditions adapted from Sano et al. (1993) and Genro et al. (2008), respectively. The characterization of the linkage disequilibrium and the estimation of haplotypes comprising

the 3'-VNTR and the Int8 VNTR polymorphisms were performed with the MLOCUS program (Long et al. 1995; Long 1999). The -839 C > T (rs2652511) polymorphism was genotyped using the Taqman SNP genotyping assays (Applied Biosystems) according to the manufacturer's recommended protocol.

### Statistical analysis

Responders and non-responders were compared regarding demographic characteristics, IQ, baseline SNAP-IV, CGI-S and SERS scores, ADHD subtype, comorbidities, use of concomitant medication, and MPH dose. The chi-square test was used for categorical variables and ANOVA for continuous variables.

The association between specific alleles or genotypes with the categorical response to MPH treatment was analyzed by logistic regression analyses. Genetic effects in the dimensional variation in SNAP-IV scores after the MPH treatment were analyzed by ANCOVA considering baseline scores as covariates. Potential confounders (demographic characteristics, IQ, ADHD subtype, comorbidities, use of concomitant medication, and MPH dose) were included as covariates using a statistical definition (association with both the study factor and outcome for  $P \leq 0.20$ ; Maldonado and Greenland 1993).

### Results

Subjects were 171 patients comprising 89 males and 82 females. The mean age of the subjects was 34.7 years ( $\pm 10.8$ ). Of the patients 93% were currently employed, and the average number of years of schooling was 13.6 years ( $\pm 3.7$ ). The average estimated full scale IQ of the sample is 101.5 ( $\pm 9.4$ ). Mean baseline scores for the overall symptoms of ADHD according to SNAP-IV and CGI-S was 1.7 ( $\pm 0.5$ ) and 4.56 ( $\pm 0.73$ ), respectively.

To confirm the general efficacy of MPH treatment in this sample, we explored effects of its use over SNAP-IV total scores during the first month of treatment. A significant reduction in total scores was detected during the follow-up period ( $t = 21.77$ ;  $P < 0.001$ ). One hundred and thirty-six patients (79.5%) responded to treatment (responders), as defined by a 30% or greater symptom reduction in SNAP-IV plus a CGI-S score of two points or less. Thirty-five participants (20.5%) failed to show a clinical response to MPH. The characteristics of both groups (responders and non-responders) are given in Table 1.

We detected six alleles at *DATI* 3'-VNTR and four alleles at Int8 VNTR in the total group of patients. The most common alleles were 10R (0.73) and 9R (0.24) for 3'VNTR, and 6R (0.78) and 5R (0.21) for Int8 VNTR. The

C and T allele frequencies of the -839 C > T polymorphism were 0.58 and 0.42, respectively. Genotype frequencies in all polymorphisms did not reveal a significant deviation from expected values for the Hardy-Weinberg equilibrium.

We focused the statistical analysis for the MPH response on the risk alleles for ADHD, similarly to previous pharmacogenetic studies of ADHD. The results of the stratified analysis of response to MPH are presented in Tables 2 and 3. There were no significant differences in genotype frequencies between MPH responders and non-responders in any *DATI* polymorphisms (Table 2). Likewise, there are no significant effects of *DATI* polymorphisms on the response to MPH evaluated through the variation between pre- and post-SNAP-IV treatments (Table 3).

### Discussion

Our study fails to show association between three different *DATI* polymorphisms and the therapeutic response to MPH treatment in Brazilian adults with ADHD. This is the first study assessing the role of the -839 C > T and the Int8 VNTR polymorphisms on the MPH response in ADHD samples. Additionally, we were not able to detect a significant effect of the haplotype comprising 10R allele (3'-VNTR) and 6R allele (Int8 VNTR), which have been previously associated with ADHD susceptibility in the samples of children (Brookes et al. 2006; Asherson et al. 2007), or with the 9R-6R haplotype, which has been associated with ADHD in adults (Franke et al. 2008).

The current report is the second to demonstrate lack of differences in the therapeutic response to MPH, based on *DATI* 3'-VNTR genotypes, in adults with ADHD (Mick et al. 2006). Only one study found a positive association between 10R allele homozygosis and a reduced effect of MPH over ADHD symptoms (Kooij et al. 2008) in adults. This association, however, should be considered with caution, due to the reduced sample size ( $N = 42$ ). Overall, the effect of 3'-VNTR allele/genotype on therapeutic response to MPH, even in samples of children, is not conclusive, since there are conflicting associations with 9R (Stein et al. 2005; Joobar et al. 2007) and 10R alleles and a worse (Winsberg and Comings. 1999; Roman et al. 2002; Cheon et al. 2005; Purper-Ouakil et al. 2008) or better (Kirley et al. 2003; Bellgrove et al. 2005) response to MPH. Additionally, there are also several studies with negative findings (Hamarman et al. 2003; Langley et al. 2005; Van der Meulen et al. 2005; McGough et al. 2006; Zeni et al. 2007; Tharoor et al. 2008; Kereszturi et al. 2008). In these studies, methodological aspects such as variability in design, diagnostic and outcome measures, as well as failure to control for confounding factors have been hypothesized to be related to these differing

**Table 2** Association of *DAT1* polymorphisms and categorical response to MPH

<i>DAT1</i> polymorphism	Genotype ( <i>N</i> )	Responders <i>N</i> (%)	Non-responders <i>N</i> (%)	<i>P</i>
-839 C > T	CC + CT (146)	117 (87.3%)	29 (85.3%)	0.93 <sup>a,b,c,d</sup>
	TT (22)	17 (12.7%)	5 (14.7%)	
Int8 VNTR	5R/5R	7 (5.3%)	3 (8.8%)	0.37
	5R/6R	42 (32.1%)	7 (20.6%)	
	6R/6R	24 (70.6%)	24 (70.6%)	
3'-VNTR	10R/10R (92)	71 (52.6%)	21 (60%)	0.25 <sup>a,b</sup>
	Others (78)	64 (47.4%)	14 (40%)	
Haplotype <sup>e</sup>	10R/6R (142)	113 (91.1%)	29 (87.9%)	0.58
	Others (15)	11 (8.9%)	4 (12.1%)	

*DAT1* dopamine transporter gene, *MPH* methylphenidate hydrochloride, *IQ* intelligence quotient, *SERS* Barkley Effect Rating scale, *SNAP-IV* Swanson, Nolan, and Pelham Scale version IV

Potential confounders considered in the analyses: <sup>a</sup> IQ, <sup>b</sup> SERS baseline scores, <sup>c</sup> total SNAP-IV baseline scores, and <sup>d</sup> inattentive SNAP-IV baseline scores

<sup>e</sup> Haplotype comprising the 3'-VNTR and the Int8 VNTR polymorphisms of *DAT1* gene

*P* value calculated by logistic regression analyses

**Table 3** Association of *DAT1* polymorphisms and response to MPH according to SNAP-IV scores

<i>DAT1</i> polymorphism	Genotype ( <i>N</i> )	Hyperactivity		Inattention		Total ADHD		Opposition	
		ΔSNAP-IV	<i>P</i>	ΔSNAP-IV	<i>P</i>	ΔSNAP-IV	<i>P</i>	ΔSNAP-IV	<i>P</i>
-839 C > T	CC + CT (146)	0.77 (0.64)	0.96 <sup>a,b</sup>	1.10 (0.65)	0.32 <sup>a,c</sup>	0.94 (0.57)	0.55 <sup>a,d</sup>	0.47 (0.58)	0.55 <sup>e</sup>
	TT (22)	0.72 (0.56)		1.02 (0.53)		0.88 (0.47)		0.29 (0.31)	
Int8 VNTR	5R/5R (10)	0.63 (0.57)	0.07 <sup>b</sup>	1.22 (0.45)	0.51 <sup>c</sup>	0.93 (0.44)	0.52 <sup>d</sup>	0.23 (0.41)	0.27 <sup>e</sup>
	5R/6R (49)	0.87 (0.61)		0.99 (0.61)		0.93 (0.54)		0.38 (0.50)	
	6R/6R (105)	0.72 (0.65)		1.11 (0.65)		0.92 (0.58)		0.47 (0.55)	
3'-VNTR	10R/10R (92)	0.78 (0.65)	0.94 <sup>a,b</sup>	1.08 (0.68)	0.90 <sup>a,c</sup>	0.94 (0.58)	0.88 <sup>a,d</sup>	0.44 (0.55)	0.45 <sup>e</sup>
	Others (78)	0.75 (0.62)		1.09 (0.58)		0.92 (0.54)		0.46 (0.54)	
Haplotype <sup>e</sup>	10R/6R (142)	0.79 (0.65)	0.19 <sup>b</sup>	1.09 (0.65)	0.67 <sup>c</sup>	0.94 (0.57)	0.26 <sup>d</sup>	0.45 (0.55)	0.21 <sup>e</sup>
	Others (15)	0.74 (0.59)		1.13 (0.53)		0.93 (0.52)		0.25 (0.36)	

*DAT1* dopamine transporter gene, *MPH* methylphenidate hydrochloride, *SNAP-IV* Swanson, Nolan, and Pelham Scale version IV, *SD* standard deviation, *IQ* intelligence quotient

ΔSNAP-IV: baseline—endpoint SNAP-IV scores (mean ± SD)

*P* value calculated by ANCOVA. Potential confounders considered in analyses: <sup>a</sup> IQ, <sup>b</sup> hyperactivity baseline SNAP-IV scores, <sup>c</sup> inattention baseline SNAP-IV scores, <sup>d</sup> total baseline SNAP-IV scores, and <sup>e</sup> opposition baseline SNAP-IV scores

<sup>f</sup> Haplotype comprising 3'-UTR VNTR and Int8 VNTR polymorphisms of *DAT1* gene

results (Polanczyk et al. 2005, 2008). Some of the positive findings could actually be spurious, especially due to inadequate sample sizes. Colhoun et al. (2003) suggested that the most probable explanation for difficulty in replication of reports of genetic associations with complex diseases is the failure to exclude chance.

Converging evidence from animal and human studies points to dysregulation of frontal–subcortical–cerebellar catecholaminergic circuits in the pathophysiology of ADHD (Biederman and Faraone 2005; Prince 2008). There is evidence that patients with ADHD show an elevated striatal DAT activity, compared to controls (Dougherty et al. 1999; Krause et al. 2000; Dresel et al. 2000; Cheon

et al. 2003). Additionally, recent studies suggested the association of low DAT activity and poor response to MPH treatment (Krause et al. 2005; La Fougère et al. 2006). These results might be in accordance with the present study in the finding that subjects homozygous for the *C* allele in the -839 C > T polymorphism tended to achieve adequate therapeutic response with lower MPH dose (*P* = 0.09), possibly due to increased availability of synaptic DA secondary to reduced DAT expression. This is supported by different in vitro (Rubie et al. 2001) and in vivo (Drgon et al. 2006) studies showing increased DAT expression associated to *C* allele. Increased evidence of this association will require larger studies specifically designed to

address  $-839\text{ C} > \text{T}$  genotype differences in order to assess dose–response relationship in ADHD patients.

Despite the fact that this is the largest sample of adults with ADHD ever presented in pharmacogenetic studies, some limitations should be considered in the understanding of these results. We did not have a placebo arm in this trial, and so we did not have an internal control to correct for any effect of time. The rate of improvement of ADHD symptoms, however, was similar to those generally found in placebo-controlled studies. Since we performed very conservative analyses (inclusion of potential confounders in analyses as covariates) in a moderate sample, we could not exclude type II error. The interpretation of the present results should be limited to this specific sample, since sample size is still quite small (especially considering all necessary adjustments) and future meta-analyses may provide more statistical power.

In conclusion, our data suggest that a representative group of polymorphisms in one of the most screened gene candidate (*DAT1* gene) for the pharmacogenetics of ADHD failed to reveal an important role in the MPH therapeutic response in adults with ADHD. The ability of MPH to block DA reuptake is probably not influenced by these genetic polymorphisms, at least among Brazilian adults with ADHD.

**Acknowledgment** Thanks are due to Rafael G. Karam, Felipe A. Picon, Paula O. G. da Silva, Gregory D. Zeni, and Eduardo Vitola for helping in sample collection of ADHD patients, and to Camila R. Consiglio and Felipe A. Sassi for being part of the laboratory analysis. CNPq—Instituto do Milênio, FIPE-HCPA, FAPERGS, DECIT/SCTIE/MS/PPSUS, and PRONEX funded this study.

**Conflict of interest statement** The ADHD Program received educational and research support from the following pharmaceutical companies in the last 3 years: Abbott, Bristol-Myers Squibb, Eli-Lilly, Janssen-Cilag, and Novartis. Dr Belmonte-de-Abreu is in the speaker's bureau or is a consultant for Janssen-Cilag and Bristol-Myers Squibb. Dr Grevet is in the speaker's bureau or is a consultant for Novartis and Janssen-Cilag.

## References

- Ambrosini PJ (2000) Historical development and present status of the schedule for affective disorders and schizophrenia for school-age children (K-SADS). *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 39:49–58
- American Psychiatric Association (1994) Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4th edn. American Psychiatric Association, Washington, DC
- Asherson P, Brookes K, Franke B, Chen W, Gill M, Ebstein RP, Buitelaar J, Banaschewski T, Sonuga-Barke E, Eisenberg J, Manor I, Miranda A, Oades RD, Roeyers H, Rothenberger A, Sergeant J, Steinhausen HC, Faraone SV (2007) Confirmation that a specific haplotype of the dopamine transporter gene is associated with combined-type ADHD. *Am J Psychiatry* 164:674–677
- Barkley RA (1990) Attention-deficit hyperactivity disorder: a handbook for diagnosis and treatment. Guilford Press, New York
- Bellgrove MA, Hawi Z, Kirley A, Fitzgerald M, Gill M, Robertson IH (2005) Association between dopamine transporter (*DAT1*) genotype, left-sided inattention, and an enhanced response to methylphenidate in attention-deficit hyperactivity disorder. *Neuropsychopharmacology* 30(12):2290–2297
- Biederman J, Faraone SV (2005) Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet* 16–22; 366(9481):237–248
- Brookes KJ, Mill J, Guindalini C, Curran S, Xu X, Knight J, Chen CK, Huang YS, Sethna V, Taylor E, Chen W, Breen G, Asherson P (2006) A common haplotype of the dopamine transporter gene associated with attention-deficit/hyperactivity disorder and interacting with maternal use of alcohol during pregnancy. *Arch Gen Psychiatry* 63:74–81
- Brookes KJ, Xu X, Anney R, Franke B, Zhou K, Chen W, Banaschewski T, Buitelaar J, Ebstein R, Eisenberg J, Gill M, Miranda A, Oades RD, Roeyers H, Rothenberger A, Sergeant J, Sonuga-Barke E, Steinhausen HC, Taylor E, Faraone SV, Asherson P (2008) Association of ADHD with genetic variants in the 5'-region of the dopamine transporter gene: evidence for allelic heterogeneity. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B(8):1519–1523
- Cheon KA, Ryu YH, Kim YK, Namkoong K, Kim CH, Lee JD (2003) Dopamine transporter density in the basal ganglia assessed with [<sup>123</sup>I]IPT SPET in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30(2):306–311
- Cheon KA, Ryu YH, Kim JW, Cho DY (2005) The homozygosity for 10-repeat allele at dopamine transporter gene and dopamine transporter density in Korean children with attention deficit hyperactivity disorder: relating to treatment response to methylphenidate. *Eur Neuropsychopharmacol* 15(1):95–101
- Colhoun HM, McKeigue P, Smith GD (2003) Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet* 361:865–872
- Conners CK (2002) Forty years of methylphenidate treatment in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *J Atten Disord* 6(Suppl 1):S17–S30
- Dougherty DD, Bonab AA, Spencer TJ, Rauch SL, Madras BK, Fischman AJ (1999) Dopamine transporter density in patients with attention deficit hyperactivity disorder. *Lancet* 354(9196):2132–2133
- Doyle C, Brookes K, Simpson J, Park J, Scott S, Coghill DR, Hawi Z, Kirley A, Gill M, Kent L (2009) Replication of an association of a promoter polymorphism of the dopamine transporter gene and Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Neurosci Lett* 462(2):179–181
- Dresel S, Krause J, Krause KH, LaFougere C, Brinkbäumer K, Kung HF, Hahn K, Tatsch K (2000) Attention deficit hyperactivity disorder: binding of [<sup>99m</sup>Tc]TRODAT-1 to the dopamine transporter before and after methylphenidate treatment. *Eur J Nucl Med* 27(10):1518–1524
- Drgon T, Lin Z, Wang GJ, Fowler J, Pablo J, Mash DC, Volkow N, Uhl GR (2006) Common human 5' dopamine transporter (*SLC6A3*) haplotypes yield varying expression levels in vivo. *Cell Mol Neurobiol* 26(4–6):875–889
- Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE, Smoller JW, Goralnick JJ, Holmgren MA, Sklar P (2005) Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57:1313–1323
- First MB, Spitzer RL, Gibbon M, Williams JBW (1998) Structured clinical interview for DSM-IV axis I disorders—Patient Edition (SCID-I/P, version 2.0, 8/98 revision). Biometrics Research Department, New York Psychiatry Institute
- Fischer AG, Bau CHD, Grevet EH, Salgado CA, Victor MM, Kalil KL, Sousa NO, Garcia CR, Belmonte-de-Abreu P (2007) The



- role of comorbid major depressive disorder in the clinical presentation of adult ADHD. *J Psychiatr Res* 41:991–996
- Franke B, Hoogman M, Arias Vasquez A, Heister JG, Savelkoul PJ, Naber M, Scheffer H, Kiemeneij LA, Kan CC, Kooij JJ, Buitelaar JK (2008) Association of the dopamine transporter (SLC6A3/DAT1) gene 9–6 haplotype with adult ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B(8):1576–1579
- Genro JP, Polanczyk GV, Zeni C, Oliveira AS, Roman T, Rohde LA, Hutz MH (2008) A common haplotype at the dopamine transporter gene 5' region is associated with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B(8):1568–1575
- Giros B, el Mestikawy S, Godinot N, Zheng K, Han H, Yang-Feng T, Caron MG (1992) Cloning, pharmacological characterization, and chromosome assignment of the human dopamine transporter. *Mol Pharmacol* 42:383–390
- Grevet EH, Bau CHD, Salgado CA, Fischer A, Victor MM, Garcia C, Sousa NO, Nerung L, Belmonte-de-Abreu (2005) Interrater reliability for diagnosis in adults of attention deficit hyperactivity disorder and oppositional defiant disorder using K-SADS-E. *Arq Neuropsiquiatr* 63:307–310
- Grevet EH, Bau CHD, Salgado CA, Fischer AG, Kalil K, Victor MM, Garcia CR, Sousa NO, Rohde LA, Belmonte-de-Abreu (2006) Lack of gender effects on subtype outcomes in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: support for the validity of subtypes. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 256:311–319
- Guy W (1976) ECDU assessment manual for psychopharmacology, revised. US Department of Health, Education and Welfare, Bethesda
- Hamman S, Ulger C, Fossella J, Brimacombe M, Dermody J (2003) Influence of dopamine genes on stimulant response in ADHD children. In: Proceedings of the 50th annual meeting of the American academy of child and adolescent psychiatry, Miami
- Joober R, Grizenko N, Sengupta S, Amor LB, Schmitz N, Schwartz G, Karama S, Lageix P, Fathalli F, Torkaman-Zehi A, Ter Stepanian M (2007) Dopamine transporter 3'-UTR VNTR genotype and ADHD: a pharmaco-behavioural genetic study with methylphenidate. *Neuropsychopharmacology* 32(6):1370–1376
- Kereszturi E, Tarnok Z, Bogner E, Lakatos K, Farkas L, Gadoros J, Sasvari-Szekely M, Nemoda Z (2008) Catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism is associated with methylphenidate response in ADHD children. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B(8):1431–1435
- Kirley A, Lowe N, Hawi Z, Mullins C, Daly G, Waldman I, McCarron M, O'Donnell D, Fitzgerald M, Gill M (2003) Association of the 480 bp DAT1 allele with methylphenidate response in a sample of Irish children with ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 121B(1):50–54
- Kooij JS, Boonstra AM, Vermeulen SH, Heister AG, Burger H, Buitelaar JK, Franke B (2008) Response to methylphenidate in adults with ADHD is associated with a polymorphism in SLC6A3 (DAT1). *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B(2):201–208
- Krause KH, Dresel SH, Krause J, Kung HF, Tatsch K (2000) Increased striatal dopamine transporter in adult patients with attention deficit hyperactivity disorder: effects of methylphenidate as measured by single photon emission computed tomography. *Neurosci Lett* 285:107–110
- Krause J, la Fougere C, Krause KH, Ackenheil M, Dresel SH (2005) Influence of striatal dopamine transporter availability on the response to methylphenidate in adult patients with ADHD. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 255(6):428–431
- la Fougère C, Krause J, Krause KH, Josef Gildehaus F, Hacker M, Koch W, Hahn K, Tatsch K, Dresel S (2006) Value of 99mTc-TRODAT-1 SPECT to predict clinical response to methylphenidate treatment in adults with attention deficit hyperactivity disorder. *Nucl Med Commun* 27(9):733–737
- Lahiri DK, Nurnberger JI Jr (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 11:5444
- Langley K, Turic D, Peirce TR, Mills S, Van Den Bree MB, Owen MJ, O'Donovan MC, Thapar A (2005) No support for association between the dopamine transporter (DAT1) gene and ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 139(1):7–10
- Li D, Sham PC, Owen MJ, He L (2006) Meta-analysis shows significant association between dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Hum Mol Genet* 15:2276–2284
- Long JC (1999) Multiple locus haplotype analysis, version 3.0. Software and documentation distributed by the author. Department of Human Genetics, University of Michigan Medical School, 4909 Buhl Bldg., Ann Arbor, MI 4819-0618
- Long JC, Williams RC, Urbanek M (1995) An E-M algorithm and testing strategy for multiple locus haplotypes. *Am J Hum Genet* 56:799–810
- Maher BS, Marazita ML, Ferrell RE, Vanyukov MM (2002) Dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis. *Psychiatr Genet* 12(4):207–215
- Maldonado G, Greenland S (1993) Simulation study of confounder-selection strategies. *Am J Epidemiol* 138(11):923–936
- McGough J, McCracken J, Swanson J, Riddle M, Kollins S, Greenhill L, Abikoff H, Davies M, Chuang S, Wigal T, Wigal S, Posner K, Skrobala A, Kastelic E, Ghuman J, Cunningham C, Shigawa S, Moyzis R, Vitiello B (2006) Pharmacogenetics of methylphenidate response in preschoolers with ADHD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 45(11):1314–1322
- Mercadante MT, Asbahar F, Rosário MC, Ayres AM, Karmam L, Ferrari MC et al (1995) K-SADS, entrevista semi-estruturada para diagnóstico em psiquiatria da infância (versão epidemiológica). FMUSP, São Paulo
- Mick E, Biederman J, Spencer T, Faraone SV, Sklar P (2006) Absence of association with DAT1 polymorphism and response to methylphenidate in a sample of adults with ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141B(8):890–894
- Polanczyk G, Zeni C, Genro JP, Roman T, Hutz MH, Rohde LA (2005) Attention-deficit/hyperactivity disorder: advancing on pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 6(3):225–234
- Polanczyk G, Lima MS, Horta BL, Biederman J, Rohde LA (2007) The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and meta-regression analysis. *Am J Psychiatry* 164(6):942–948
- Polanczyk G, Faraone SV, Bau CH, Victor MM, Becker K, Pelz R, Buitelaar JK, Franke B, Kooij S, van der Meulen E, Cheon KA, Mick E, Purper-Ouakil D, Gorwood P, Stein MA, Cook EH Jr, Rohde LA (2008) The impact of individual and methodological factors in the variability of response to methylphenidate in ADHD pharmacogenetic studies from four different continents. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B(8):1419–1424
- Prince J (2008) Catecholamine dysfunction in attention-deficit/hyperactivity disorder: an update. *J Clin Psychopharmacol* Jun; 28(3 Suppl 2):S39–S45
- Purper-Ouakil D, Wohl M, Mouren MC, Verpillat P, Adès J, Gorwood P (2005) Meta-analysis of family-based association studies between the dopamine transporter gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr Genet* 15(1):53–59
- Purper-Ouakil D, Wohl M, Orejarena S, Cortese S, Boni C, Asch M, Mouren MC, Gorwood P (2008) Pharmacogenetics of methylphenidate response in attention deficit/hyperactivity disorder: association with the dopamine transporter gene (SLC6A3). *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B(8):1425–1430

- Roman T, Szobot C, Martins S, Biederman J, Rohde LA, Hutz MH (2002) Dopamine transporter gene and response to methylphenidate in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pharmacogenetics* 12:497–499
- Rösler M, Fischer R, Ammer R, Ose C, Retz W (2009) A randomised, placebo-controlled, 24-week, study of low-dose extended-release methylphenidate in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 259(2):120–129
- Rubie C, Schmidt F, Knapp M, Sprandel J, Wiegand C, Meyer J, Jungkunz G, Riederer P, Stober G (2001) The human dopamine transporter gene: the 5'-flanking region reveals five diallelic polymorphic sites in a Caucasian population sample. *Neurosci Lett* 297:125–128
- Sano A, Kondoh K, Kakimoto Y, Kondo I (1993) A 40-nucleotide repeat polymorphism in the human dopamine transporter gene. *Hum Genet* 91(4):405–406
- Seeman P, Madras BK (1998) Anti-hyperactivity medication: methylphenidate and amphetamine. *Mol Psychiatry* 3:386–396
- Sheehan DV, Lecrubier Y, Sheehan KH, Amorim P, Janavs J, Weiller E, Hergueta T, Baker R, Dunbar GC (1998) The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): the development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10. *J Clin Psychiatry* 59:22–57
- Simon V, Czobor P, Bálint S, Mészáros A, Bitter I (2009) Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis. *Br J Psychiatry* (194)3:204–211
- Solanto MV (1998) Neuropsychopharmacological mechanisms of stimulant drug action in attention-deficit hyperactivity disorder: a review and integration. *Behav Brain Res* 94:127–152
- Spencer TJ, Biederman J, Mick E (2007) Attention-deficit/hyperactivity disorder: diagnosis, lifespan, comorbidities, and neurobiology. *J Pediatr Psychol* 32(6):631–642
- Stein MA, Waldman ID, Sarampote CS, Seymour KE, Robb AS, Conlon C, Kim SJ, Cook EH (2005) Dopamine transporter genotype and methylphenidate dose response in children with ADHD. *Neuropsychopharmacology* 30(7):1374–1382
- Swanson JM (1992) School-based assessments and interventions for ADD students. KC Publishing, Irvine
- Tharoor H, Lobos EA, Todd RD, Reiersen AM (2008) Association of dopamine, serotonin, and nicotinic gene polymorphisms with methylphenidate response in ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B(4):527–530
- Van der Meulen EM, Bakker SC, Pauls DL, Oteman N, Kruitwagen CL, Pearson PL, Sinke RJ, Buitelaar JK (2005) High sibling correlation on methylphenidate response but no association with DAT1—10R homozygosity in Dutch sibpairs with ADHD. *J Child Psychol Psychiatry* 46(10):1074–1080
- Vandenbergh DJ, Persico AM, Hawkins AL, Griffin CA, Li X, Jabs EW, Uhl GR (1992) Human dopamine transporter gene (DAT1) maps to chromosome 5p15.3 and displays a VNTR. *Genomics* 14(4):1104–1106
- Victor MM, Grevet EH, Salgado CA, Silva KL, Sousa NO, Karam RG, Vitola ES, Picon FA, Zeni GD, Contini V, Rohde LA, Belmonte-de-Abreu P, Bau CH (2009) Reasons for pretreatment attrition and dropout from methylphenidate in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: the role of comorbidities. *J Clin Psychopharmacol* 29(6):614–616
- Wechsler D (1981) WAIS-R—Manual for the Wechsler Adult Intelligence Scale—Revised. The Psychological Corporation, San Antonio
- Winsberg BG, Comings DE (1999) Association of the dopamine transporter gene (DAT1) with poor methylphenidate response. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 38:1474–1477
- Xu X, Mill J, Sun B, Chen CK, Huang YS, Wu YY, Asherson P (2009) Association study of promoter polymorphisms at the dopamine transporter gene in attention deficit hyperactivity disorder. *BMC Psychiatry* 5:3–9
- Zeni CP, Guimarães AP, Polanczyk GV, Genro JP, Roman T, Hutz MH, Rohde LA (2007) No significant association between response to methylphenidate and genes of the dopaminergic and serotonergic systems in a sample of Brazilian children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144(3):391–394

**Capítulo IV**

---

**ADRENERGIC  $\alpha$ 2A RECEPTOR GENE IS NOT ASSOCIATED  
WITH METHYLPHENIDATE RESPONSE IN ADULTS WITH ADHD  
European Archives of Psychiatric and Clinical Neuroscience  
(2011): 261:205-211**

## Adrenergic $\alpha 2A$ receptor gene is not associated with methylphenidate response in adults with ADHD

Verônica Contini · Marcelo M. Victor · Caio C. S. Cerqueira · Evelise R. Polina · Eugênio H. Grevet · Carlos A. I. Salgado · Rafael G. Karam · Eduardo S. Vitola · Paulo Belmonte-de-Abreu · Claiton H. D. Bau

Received: 26 May 2010 / Accepted: 9 November 2010 / Published online: 20 November 2010  
© Springer-Verlag 2010

**Abstract** Adrenergic  $\alpha 2A$  receptor gene (*ADRA2A*) is one of the most promising candidate genes for ADHD pharmacogenetics. Thus far, three studies have investigated the association between the *ADRA2A* –1291 C>G polymorphism and the therapeutic response to methylphenidate (MPH) in children with ADHD, all of them with positive results. The aim of this study is to investigate, for the first time, the association between three *ADRA2A* polymorphisms (–1291 C>G, –262 G>A, and 1780 C>T) and the response to MPH in adults with ADHD. The sample comprises 165 Brazilians of European descent evaluated in the adult ADHD outpatient clinic of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The diagnostic procedures followed the DSM-IV criteria. Drug response was assessed by both categorical and dimensional approaches, through the scales Swanson, Nolan, and Pelham Rating scale version IV and the Clinical Global Impression-Severity Scale, applied at the beginning and after the 30th day of treatment. We found no evidence of association between the three *ADRA2A* polymorphisms and

the therapeutic response to MPH treatment. Our findings do not support a significant role for the *ADRA2A* gene in ADHD pharmacogenetics, at least among adult patients.

**Keywords** Attention deficit/hyperactivity disorder · Pharmacogenetics · *ADRA2A* gene · Methylphenidate

### Introduction

Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) is a highly heritable psychiatric disorder characterized by impairments in attention, inhibitory control, and increased motor activity [1]. The core symptoms of the disorder arise during the childhood and are accompanied by high rates of comorbidities and significant social, emotional, and occupational impairments [6, 7, 55]. The worldwide prevalence of ADHD is estimated in 5.3% in children and adolescents [42] and 2.5% in adults [50].

Although the precise mechanisms of ADHD development are not completely understood, converging evidence from genetic and neurobiology studies strongly suggest that dysfunctions in the catecholamine neurotransmission play a crucial role in the pathophysiology of the disorder [4, 45]. In accordance, the clinical experience has demonstrated that stimulant drugs, which potentiate the catecholamine neurotransmission, are the most effective ADHD treatment [24, 59]. Methylphenidate hydrochloride (MPH) is the most prescribed psychostimulant for children and adults with ADHD and several controlled clinical trials have proven the effectiveness and safety of the treatment [8, 15, 24, 28]. However, many patients still do not show an appropriate clinical response to the MPH treatment [29, 51, 52]. Additionally, there is a considerable variability in dosage, tolerability, and adherence among responders [9, 20].

V. Contini · C. C. S. Cerqueira · E. R. Polina ·  
C. H. D. Bau (✉)

Department of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Caixa Postal 15053, CEP 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil  
e-mail: claiton.bau@ufrgs.br

M. M. Victor · E. H. Grevet · C. A. I. Salgado ·  
R. G. Karam · E. S. Vitola · P. Belmonte-de-Abreu ·  
C. H. D. Bau

Adult ADHD Outpatient Clinic, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

P. Belmonte-de-Abreu  
Department of Psychiatry, Faculdade de Medicina,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
Porto Alegre, RS, Brazil

Taking into account this scenario, several efforts to identify genetic factors associated with the variability in the therapeutic response to MPH treatment have focused on catecholaminergic genes, but most loci have not revealed robust findings across replications. Likewise, the results of the first genome-wide association study for the response to MPH did not reveal any markers that met criteria for statistical significance genome wide [38]. Among the most promising pharmacogenetic findings revealed is the adrenergic  $\alpha$ 2A receptor gene (*ADRA2A*) [17, 27]. In fact, *ADRA2A* is also a candidate gene in ADHD etiology. A meta-analysis revealed substantial heterogeneity in effect sizes of an *ADRA2A* polymorphism (1780 C>T) across studies, suggesting that more studies are warranted to explain these findings [19]. Adrenergic  $\alpha$ 2A receptors are important modulators of the prefrontal cortex (PFC) function, which is highly relevant to ADHD [3, 4], and there is evidence that  $\alpha$ 2A receptors mediate directly the therapeutic effects of MPH in the PFC [2].

Some studies have already shown an effect of the *ADRA2A* –1291 C>G polymorphism in the response to treatment in psychiatric disorders, such as depression [33, 57] and schizophrenia [40]. In ADHD, three studies have investigated the association between the –1291 C>G polymorphism and the therapeutic response to MPH in children samples [10, 12, 43]. In all studies, the presence of the G-allele was associated with improvement in ADHD symptoms after MPH treatment, providing additional evidence for the involvement of the noradrenergic system in the modulation of MPH action. Interestingly, the influence of the *ADRA2A* –1291 C>G polymorphism in the response to MPH treatment seems to be more specific for the symptoms of inattention [12, 43], which is in accordance with previous reports of an effect of the G-allele in the inattentive dimension of ADHD [41, 46, 47, 49].

Thus, considering the possible effect of the *ADRA2A* gene in therapeutic response to MPH treatment, the aim of this investigation is to evaluate the association between three *ADRA2A* polymorphisms and the clinical response to MPH in a sample of adults with ADHD. In addition to the most investigated *ADRA2A* polymorphism, –1291 C>G, we selected two other (–262 G>A and 1780 C>T), since there is evidence that the main haplotype families of the gene can be characterized by these 3 markers [30].

## Materials and methods

### Subjects

The sample comprised 165 adults with ADHD from the ADHD Outpatient Program at the Hospital de Clinicas de Porto Alegre. The inclusion criteria were as follows: (a)

Native-Brazilian of European descent; (b) age 18 years or older; (c) fulfillment of DSM-IV diagnostic criteria for ADHD [1], both currently and during childhood; and (d) eligibility to immediate-release methylphenidate (IR-MPH) treatment. Exclusion criteria were the presence of: (a) clinical contra-indication to IR-MPH; (b) any significant neurological disease (e.g., delirium, dementia, epilepsy, head trauma, multiple sclerosis); (c) current or past history of psychosis; (d) intelligence quotient (IQ) <70, and (e) current clinically significant comorbid disorders (excluding tobacco dependence, oppositional defiant disorder (ODD), and antisocial personality disorder). The project was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Institutional Review Board (IRB) of the hospital (IRB # 00000921). All patients signed an informed consent. This protocol is part of a larger study on predictors of MPH treatment response, including phenotypic characteristics [56].

The diagnostic procedures in our unit have been described elsewhere [16, 22, 25]. Briefly, diagnoses of ADHD and comorbidities were achieved through the following semi-structured interviews: (1) K-SADS-E (Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children-Epidemiologic Version), adapted to adults as described in Grevet et al. [21] and Karam et al. [26], for ADHD and ODD; (2) SCID-IV-R (Structured Clinical Interview for DSM-IV) for the Axis I psychiatric comorbidities, and (3) M.I.N.I (Mini-international Psychiatric Interview) for the diagnoses of conduct and antisocial personality disorder. The estimated IQ scores were obtained from the vocabulary and block design subtests of the Wechsler Adult Intelligence Scale—Revised (WAIS-R) [58] administered by a trained psychologist.

### Pharmacological intervention and drug response

Patients were treated with weekly increases in IR-MPH dose until symptom control or occurrence of limiting adverse effects. All patients took at least the minimum MPH dose of 0.3 mg/kg/day. Although this dose is considered low, there is evidence that it may be effective [48]. IR-MPH was administered twice or three times a day according to the patient's daily activities. Patients were usually reassessed one or two times in a period of 30 days after initiation and titration of IR-MPH. The final measurements were taken after the 30th day of treatment.

The outcome measures of MPH treatment were the Portuguese version of the Swanson, Nolan, and Pelham Rating Scale version IV (SNAP-IV) [54] and the Clinical Global Impression-Severity scale (CGI-S) [23]. Stimulants side effects were assessed with the Barkley Side Effect Rating Scale (SERS) [5]. All scales were applied at the beginning of the treatment (baseline levels) and after the

30th day of treatment. A detailed description of the application of these scales in MPH pharmacogenetics is in accordance with Contini et al. [11].

Drug response was assessed by both categorical and dimensional approaches. The a priori categorical definition of response was a 30% or greater symptom reduction in SNAP-IV and a CGI-S score of two points or less. The dimensional evaluation of drug response was measured by the variation in SNAP-IV scores.

#### Laboratory methods

DNA was extracted from whole blood by an adaptation of Lahiri and Nurnberger [31]. The *ADRA2A* -1291 C>G (rs1800544) polymorphism was amplified using the polymerase chain reaction (PCR) conditions adapted from Lario et al. [32] and Lima et al. [34]. The -262 G>A (rs1800545) and the 1780 C>T (rs553668) polymorphisms were genotyped using the Taqman SNP genotyping assays (Applied Biosystems), according to the manufacturer's recommended protocol.

#### Statistical analysis

Responders and non-responders were compared regarding demographic characteristics, IQ, baseline SNAP-IV, CGI-S and SERS scores, ADHD subtype, comorbidities, use of concomitant medication, and MPH dose. The chi-square test was used for categorical variables and the ANOVA test for continuous variables. The characterization of the linkage disequilibrium and the estimation of the haplotypes comprising the three *ADRA2A* polymorphisms were performed with the MLOCUS program [35, 36].

The association between specific alleles or haplotypes with the categorical response to MPH treatment was analyzed by logistic regression analyses. Genetic effects in the dimensional variation in SNAP-IV scores after the MPH treatment were analyzed by ANCOVA considering baseline scores as covariates. Potential confounders (demographic characteristics, IQ, ADHD subtype, comorbidities, use of concomitant medication, and MPH dose) were included as covariates using a statistical definition (association with both the study factor and outcome for a  $P \leq 0.20$ ) [37].

## Results

The sample comprised 90 men and 75 women. The mean age of the subjects was 35 years ( $\pm 11$ ). Ninety-three percent of patients were currently employed, and the average number of years of schooling was 13.9 ( $\pm 3.6$ ). The average estimated full scale IQ of the sample is 101.6 ( $\pm 9.5$ ). Mean

baseline scores for the overall symptoms of ADHD according to the SNAP-IV and CGI-S were 1.7 ( $\pm 0.5$ ) and 4.5 ( $\pm 0.7$ ), respectively. The most frequent comedications were antidepressants and mood stabilizers, with no significant evidence for pharmacointeractions.

To confirm the general efficacy of MPH treatment in this sample, we explored effects of its use over SNAP-IV total scores during the first month of treatment. A significant reduction in total scores was detected during the follow-up period ( $t = 22.90$ ;  $P < 0.001$ ). One hundred and thirty-seven patients (83%) responded to treatment (responders), as defined by a 30% or greater symptom reduction in SNAP-IV plus a CGI-S score of two points or less. Twenty-eight participants (17%) failed to show a clinical response to MPH. The characteristics of both groups (responders and non-responders) are given in Table 1.

The estimated allele frequencies for the *ADRA2A* polymorphisms were (1) 0.67 (C) and 0.33 (G) for the -1291 C>G; (2) 0.88 (G) and 0.12 (A) for the -262 G>A and (3) 0.80 (C) and 0.20 (T) for the 1780 C>T. Genotype frequencies in all polymorphisms did not reveal a significant deviation from expected values for the Hardy-Weinberg equilibrium (all  $P > 0.20$ ). The haplotype analysis revealed that the polymorphisms are in strong linkage disequilibrium. The pairwise linkage disequilibrium was as follows: -1291/-262:  $D' = 1.00$ ,  $r^2 = 0.28$ ,  $P < 0.001$ ; -1291/1780:  $D' = 0.95$ ,  $r^2 = 0.46$ ,  $P < 0.001$ ; -262/1780:  $D' = 1.00$ ,  $r^2 = 0.034$ ,  $P < 0.001$ . The most frequent haplotypes observed in our sample and respective frequencies were C-1291/G-262/C1780 (0.67); G-1291/G-262/T1780 (0.19), and G-1291/A-262/C1780 (0.12).

Considering the low frequency of homozygous genotypes for the less frequent alleles, the statistical analyses for the MPH response were performed between carriers (homozygous plus heterozygous) and non-carriers of the rare alleles. In the haplotype analysis, we focused on the risk haplotype for ADHD (G-1291/G-262/T1780) (carriers vs. non-carriers), as suggested by Park et al. [41]. The results of the stratified analysis of response to MPH are presented in Tables 2 and 3. There were no significant differences in genotype or haplotype frequencies between MPH responders and non-responders in any *ADRA2A* polymorphisms (Table 2). Likewise, there are no significant effects of the *ADRA2A* polymorphisms on the response to MPH evaluated through the variation between pre- and post-treatment SNAP-IV scores (Table 3).

## Discussion

This is the first pharmacogenetic investigation into *ADRA2A* polymorphisms in adults with ADHD, a gene with promising findings in previous studies of children

**Table 1** Demographic and clinical characteristics of the sample according to MPH response

Characteristic	Total N = 165	Responders N = 137	Non-responders N = 28	P*
Age, median ( $\pm$ SD)	35 ( $\pm$ 11)	34 ( $\pm$ 11)	37 ( $\pm$ 11)	0.18
Sex: Male, N (%)	90 (54.5)	71 (51.8)	19 (67.9)	0.12
IQ, median ( $\pm$ SD) <sup>a</sup>	101.6 (9.5)	101.7 (9.9)	101.4 (8.1)	0.91
ADHD subtype, N (%) <sup>b</sup>				
Combined	92 (56.1)	79 (57.7)	13 (48.2)	0.60
Inattentive	64 (39.0)	52 (37.9)	12 (44.4)	
Hyperactive	8 (4.9)	6 (4.4)	2 (7.4)	
Lifetime comorbid conditions, N (%) <sup>b</sup>				
Any bipolar disorder	18 (11.0)	15 (11.0)	3 (10.7)	1.00
Major depression	50 (30.5)	46 (33.8)	4 (14.3)	0.04
Generalized anxiety disorder	19 (11.6)	16 (11.8)	3 (10.7)	1.00
Oppositional defiant disorder	57 (43.8)	48 (35.3)	9 (32.1)	0.75
Antisocial personality disorder	13 (7.9)	11 (8.1)	2 (7.1)	0.87
Alcohol dependence	9 (5.5)	6 (4.4)	3 (10.7)	0.18
Nicotine use	72 (43.9)	62 (45.6)	10 (35.7)	0.34
SNAP-IV baseline scores, median ( $\pm$ SD)				
Total	1.71 ( $\pm$ 0.52)	1.73 ( $\pm$ 0.51)	1.61 ( $\pm$ 0.52)	0.26
Inattentive	1.86 ( $\pm$ 0.54)	1.87 ( $\pm$ 0.53)	1.81 ( $\pm$ 0.62)	0.57
Hyperactivity-impulsivity	1.56 ( $\pm$ 0.71)	1.59 ( $\pm$ 0.70)	1.41 ( $\pm$ 0.73)	0.22
Oppositional	0.85 ( $\pm$ 0.63)	0.85 ( $\pm$ 0.64)	0.85 ( $\pm$ 0.58)	0.98
CGI-S baseline scores, median ( $\pm$ SD)	4.50 ( $\pm$ 0.72)	4.56 ( $\pm$ 0.74)	4.21 ( $\pm$ 0.57)	0.02
Concomitant use of medication, N (%)	22 (13.3)	17 (12.4)	5 (17.9)	0.54
MPH dose, mg/kg median ( $\pm$ SD)				
At baseline	0.15 ( $\pm$ 0.06)	0.15 ( $\pm$ 0.06)	0.14 ( $\pm$ 0.06)	0.69
At endpoint	0.52 ( $\pm$ 0.20)	0.51 ( $\pm$ 0.21)	0.53 ( $\pm$ 0.16)	0.69
SERS baseline score, median ( $\pm$ SD) <sup>c</sup>	38.37 ( $\pm$ 23.55)	36.75 ( $\pm$ 22.91)	45.83 ( $\pm$ 25.68)	0.14

MPH methylphenidate hydrochloride, SD standard deviation, IQ intelligence coefficient, ADHD attention/deficit hyperactivity disorder, SNAP-IV Swanson, Nolan, and Pelham scale version IV, CGI-S clinical global impression, severity scale, SERS Barkley effect rating scale

\* Responders and non-responders were compared using the chi-square (categorical variables) or the ANOVA test (continuous variables)

<sup>a</sup> Total N = 140; responders N = 115, non-responders N = 25

<sup>b</sup> One patient with missing information

<sup>c</sup> Total N = 101; responders N = 83, non-responders N = 1

**Table 2** Association of ADRA2A polymorphisms with categorical response to MPH

ADRA2A polymorphism	Genotype (N)	Responders N (%)	Non-responders N (%)	P*	OR (CI)
-1291 C>G	CC (64)	53 (44.2)	11 (45.8)	1.00 <sup>a</sup>	1.00 (0.41–2.45)
	CG+GG (80)	67 (55.8)	13 (54.2)		
-262 G>A	GG (125)	106 (78.5)	19 (70.4)	0.55 <sup>b,c</sup>	0.75 (0.29–1.94)
	GA+AA (37)	29 (21.5)	8 (29.6)		
1780 C>T	CC (100)	85 (63.4)	16 (59.3)	0.34 <sup>a,b</sup>	0.65 (0.26–1.57)
	CT+TT (60)	49 (36.6)	11 (40.7)		
Haplotype	-1291G/-262G/1780T (59)	49 (36.3)	10 (37.0)	0.73 <sup>a</sup>	0.86 (0.36–2.06)
	Others (103)	86 (63.7)	17 (63.0)		

ADRA2A adrenergic  $\alpha$ 2A receptor gene, MPH methylphenidate hydrochloride, OR odds ratio, CI confidence interval

\* Calculated by logistic regression analyses. Potential confounders considered in analyses: <sup>a</sup> age; <sup>b</sup> sex; <sup>c</sup> alcohol dependence (lifetime)

**Table 3** Association of *ADRA2A* polymorphisms with response to MPH according to SNAP-IV scores

ADRA2A Polymorphism	Genotype (N)	Hyperactivity		Inattention		Total ADHD		Opposition	
		$\Delta$ SNAP-IV	P*	$\Delta$ SNAP-IV	P*	$\Delta$ SNAP-IV	P*	$\Delta$ SNAP-IV	P*
-1291 C>G	CC (64)	0.87	0.59 <sup>a</sup>	1.00	0.33 <sup>b</sup>	0.93	0.85 <sup>c</sup>	0.50	0.63 <sup>d</sup>
	CG+GG (80)	0.89		1.17		1.03		0.46	
-262 G>A	GG (125)	0.88	0.42 <sup>a</sup>	1.07	0.86 <sup>b,e,f</sup>	0.97	0.58 <sup>c</sup>	0.49	0.24 <sup>d,f</sup>
	GA+AA (37)	0.92		1.23		1.07		0.48	
1780 C>T	CC (101)	0.94	0.20 <sup>a,g</sup>	1.12	0.62 <sup>b,e,h</sup>	1.03	0.54 <sup>c</sup>	0.53	0.60 <sup>d,g,h,i</sup>
	CT+TT (60)	0.79		1.09		0.94		0.41	
Haplotype	-1291G/-262G/1780T (59)	0.82	0.20 <sup>a,g</sup>	1.11	0.81 <sup>b</sup>	0.96	0.69 <sup>c</sup>	0.41	0.54 <sup>d,g,i</sup>
	Others (103)	0.93		1.10		1.01		0.52	

*ADRA2A* adrenergic  $\alpha 2A$  receptor gene, *MPH* methylphenidate hydrochloride, *SNAP-IV* Swanson, Nolan, and Pelham scale version IV, *SD* standard deviation,  $\Delta$  *SNAP-IV* baseline—endpoint *SNAP-IV* scores (mean  $\pm$  SD)

\* Calculated by ANCOVA. Potential confounders considered in analyses: <sup>a</sup> hyperactivity baseline *SNAP-IV* scores; <sup>b</sup> inattention baseline *SNAP-IV* scores; <sup>c</sup> total baseline *SNAP-IV* scores; <sup>d</sup> opposition baseline *SNAP-IV* scores; <sup>e</sup> sex; <sup>f</sup> MPH dose (at endpoint); <sup>g</sup> nicotine use; <sup>h</sup> age; <sup>i</sup> concomitant use of medication

with ADHD. However, we found no evidence of association between three *ADRA2A* polymorphisms (-1291 C>G, -262 G>A, and 1780 C>T) or haplotypes and the response to MPH treatment. Although there are three previous *ADRA2A* pharmacogenetic studies, all of them with positive findings, none of them included adults. Furthermore, we assessed two additional *ADRA2A* polymorphisms, which were never investigated in ADHD pharmacogenetic studies, and performed a haplotype analysis.

The therapeutic response to MPH, similarly to other drugs, is the result of a complex matrix of factors in which several genes may play a part [53]. The fact that we did not find a putative association is consistent with the complex effect of the *ADRA2A* gene in ADHD etiology [19]. Considering the significant heterogeneity found in the meta-analysis of association studies [19], we cannot rule out the possibility of heterogeneity in pharmacogenetic studies as well. The effect of *ADRA2A* polymorphisms may be related to other phenotypes, such as tobacco smoking [44] and personality [13], which could mediate the response to the treatment.

Of special interest is the fact that the all positive results for the *ADRA2A* gene in ADHD pharmacogenetic studies were found in pediatric samples, where the male/female ratio is approximately 3:1. In our sample, however, this proportion is near 1:1. This is consistent with the reported differences in male/female ratios between children and adults with ADHD [14, 18, 22, 39]. Thus, this gender difference in the sample composition of ADHD children and adults might influence pharmacogenetic results. This hypothesis is supported by a post-hoc finding that the subsample of men carrying the G-allele of the *ADRA2A* -1291C>G polymorphism tended to show lower

inattentive scores after MPH treatment than subjects without the G-allele ( $P = 0.08$ , data not shown).

Our study should be understood in the context of some limitations. This is not a controlled, but a naturalistic design; we did not have a placebo arm in this trial, so we did not have an internal control to correct for any effect of time. The rate of improvement in ADHD symptoms, however, was similar to those generally found in placebo-controlled studies. In addition, this limitation would be more severe if the placebo response was related to the *ADRA2A* polymorphisms assessed, which is unlikely. The lack of a strictly standardized medication titration is another limitation of our study. However, the fact that all patients were treated in a comparable manner by the same experienced psychiatrist trained in our protocol minimizes, to some extent, the limitations of the approach. Negative findings are not surprising in pharmacogenetic studies of ADHD. Currently, there is no known genetic polymorphism with substantial evidence for involvement in MPH treatment response, notably in adults [17, 27]. Another issue, considering the small effect of *ADRA2A* in ADHD, is the risk of a type II error. Our sample size, however, is similar to previous studies and analyses one of the largest samples of adults with ADHD ever presented in pharmacogenetic investigations. Therefore, if this gene plays a role in the response to MPH in ADHD patients, we propose that the effect would be small and of limited clinical relevance or limited to a subset of patients (e.g., men). In conclusion, our findings fail to support a significant role of three relevant *ADRA2A* polymorphisms in the clinical response to MPH treatment in ADHD, at least among Brazilian adults.

**Acknowledgments** Thanks are due to Felipe A. Picon, Paula O. G. da Silva, Katiane Silva, Nyvia O. Sousa and Rafael S. Giordani for



help in the sample collection of ADHD patients and to Francine Z. Marques for part of the laboratory analysis. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Instituto do Milênio (CNPq), FIFE-HCPA, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), DECIT/SCTIE/MS/PPSUS and PRONEX funded this study.

**Conflicts of interest** The ADHD Program received educational and research support from the following pharmaceutical companies in the last 3 years: Abbott, Bristol-Myers Squibb, Eli-Lilly, Janssen-Cilag, and Novartis. Dr Belmonte-de-Abreu is on the speaker's bureau or is a consultant for Janssen-Cilag and Bristol-Myers Squibb. Dr Grevet is on the speaker's bureau or is a consultant for Novartis and Janssen-Cilag.

## References

- American Psychiatric Association (1994) Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4th edn. American Psychiatric Association, Washington, DC
- Arnsten AF, Dudley AG (2005) Methylphenidate improves prefrontal cortical cognitive function through alpha2 adrenoceptor and dopamine D1 receptor actions: Relevance to therapeutic effects in Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Behav Brain Funct* 1(1):2
- Arnsten AF, Li BM (2005) Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biol Psychiatry* 57(11):1377–1384
- Arnsten AF (2009) Toward a new understanding of attention-deficit hyperactivity disorder pathophysiology: an important role for prefrontal cortex dysfunction. *CNS Drugs* 23(Suppl 1):33–41
- Barkley RA (1990) Attention-Deficit Hyperactivity Disorder: A Handbook for Diagnosis and Treatment. Guilford Press, New York
- Biederman J (2004) Impact of comorbidity in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychiatry* 65(Suppl 3):3–7
- Biederman J, Faraone SV (2005) Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet* 366(9481):237–248
- Brown RT, Amler RW, Freeman WS et al (2005) Treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder: overview of the evidence. *Pediatrics* 115(6):e749–e757
- Charach A, Ickowicz A, Schachar R (2004) Stimulant treatment over five years: adherence, effectiveness, and adverse effects. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 43(5):559–567
- Cheon KA, Cho DY, Koo MS et al (2009) Association between homozygosity of a G allele of the alpha-2a-adrenergic receptor gene and methylphenidate response in Korean children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 65(7):564–570
- Contini V, Victor MM, Marques FZ et al (2010) Response to methylphenidate is not influenced by DAT1 polymorphisms in a sample of Brazilian adult patients with ADHD. *J Neural Transm* 117(2):269–276
- da Silva TL, Pianca TG, Roman T et al (2008) Adrenergic alpha2A receptor gene and response to methylphenidate in attention-deficit/hyperactivity disorder-predominantly inattentive type. *J Neural Transm* 115(2):341–345
- de Cerqueira CCS, Polina ER, Contini V et al (2010) ADRA2A polymorphisms and ADHD in adults: possible mediating effect of personality. *Psychiatry Res*. doi:10.1016/j.psychres.2010.08.032
- Faraone SV, Biederman J, Weber W et al (1998) Psychiatric, neuropsychological, and psychosocial features of DSM-IV subtypes of attention-deficit/hyperactivity disorder: results from a clinically referred sample. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 37(2):185–193
- Faraone SV, Spencer T, Aleardi M et al (2004) Meta-analysis of the efficacy of methylphenidate for treating adult attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychopharmacol* 24(1):24–29
- Fischer AG, Bau CHD, Grevet EH et al (2007) The role of comorbid major depressive disorder in the clinical presentation of adult ADHD. *J Psychiatr Res* 41:991–996
- Froehlich TE, McGough JJ, Stein MA (2010) Progress and promise of attention-deficit hyperactivity disorder pharmacogenetics. *CNS Drugs* 24(2):99–117
- Gaub M, Carlson CL (1997) Gender differences in ADHD: a meta-analysis and critical review. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 36(8):1036–1045
- Gizer IR, Ficks C, Waldman ID (2009) Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet* 126(1):51–90
- Greenhill L, Beyer DH, Finkleson J et al (2002) Guidelines and algorithms for the use of methylphenidate in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Atten Disord* 6(Suppl 1):S89–100
- Grevet EH, Bau CHD, Salgado CA et al (2005) Interrater reliability for diagnosis in adults of attention deficit hyperactivity disorder and oppositional defiant disorder using K-SADS-E. *Arq Neuropsiquiatr* 63:307–310
- Grevet EH, Bau CHD, Salgado CA et al (2006) Lack of gender effects on subtype outcomes in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: support for the validity of subtypes. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 256:311–319
- Guy W (1976) ECDU Assessment manual for psychopharmacology, Revised. Bethesda, MD: US Department of Health, Education and Welfare
- Heal DJ, Cheetham SC, Smith SL (2009) The neuropharmacology of ADHD drugs in vivo: insights on efficacy and safety. *Neuropharmacology* 57(7–8):608–618
- Kalil KL, Bau CH, Grevet EH et al (2008) Smoking is associated with lower performance in WAIS-R Block Design scores in adults with ADHD. *Nicotine Tob Res* 10(4):683–688
- Karam RG, Bau CH, Salgado CA et al (2009) Late-onset ADHD in adults: milder, but still dysfunctional. *J Psychiatr Res* 43(7):697–701
- Kieling C, Genro JP, Hutz MH, Rohde LA (2010) A current update on ADHD pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 11(3):407–419
- Kolar D, Keller A, Golfinopoulos M et al (2008) Treatment of adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychiatr Dis Treat* 4(1):107–121
- Kooij JJ, Burger H, Boonstra AM et al (2004) Efficacy and safety of methylphenidate in 45 adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. A randomized placebo-controlled double-blind cross-over trial. *Psychol Med* 34(6):973–982
- Kurnik D, Muszkat M, Li C et al (2006) Variations in the alpha2A-adrenergic receptor gene and their functional effects. *Clin Pharmacol Ther* 79(3):173–185
- Lahiri DK, Nurnberger JI Jr (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 11:5444
- Lario S, Calls J, Cases A et al (1997) MspI identifies a biallelic polymorphism in the promoter region of the alpha 2A-adrenergic receptor gene. *Clin Genet* 51(2):129–130
- Lee HY, Kang RH, Paik JW et al (2009) Association of the adrenergic alpha 2a receptor-1291C/G polymorphism with

- weight change and treatment response to mirtazapine in patients with major depressive disorder. *Brain Res* 1262:1–6
34. Lima JJ, Feng H, Duckworth L et al (2007) Association analyses of adrenergic receptor polymorphisms with obesity and metabolic alterations. *Metabolism* 56(6):757–765
  35. Long JC, Williams RC, Urbanek M (1995) An E-M algorithm and testing strategy for multiple locus haplotypes. *Am J Hum Genet* 56:799–810
  36. Long JC (1999) Multiple locus haplotype analysis, version 3.0. Software and documentation distributed by the author. Department of Human Genetics, University of Michigan Medical School, 4909 Buhl Bldg., Ann Arbor, MI 4819-0618
  37. Maldonado G, Greenland S (1993) Simulation study of confounder-selection strategies. *Am J Epidemiol* 138(11):923–936
  38. Mick E, Neale B, Middleton FA et al (2008) Genome-wide association study of response to methylphenidate in 187 children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B(8):1412–1418
  39. Murphy K, Barkley RA (1996) Attention deficit hyperactivity disorder adults: comorbidities and adaptive impairments. *Compr Psychiatry* 37(6):393–401
  40. Park YC, Chung SH, Lee KJ et al (2006) Weight gain associated with the alpha2a-adrenergic receptor-1, 291 C/G polymorphism and olanzapine treatment. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141:394–397
  41. Park L, Nigg JT, Waldman ID et al (2005) Association and linkage of alpha-2A adrenergic receptor gene polymorphisms with childhood ADHD. *Mol Psychiatry* 10(6):572–580
  42. Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL et al (2007) The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and meta-regression analysis. *Am J Psychiatry* 164(6):942–948
  43. Polanczyk G, Zeni C, Genro JP et al (2007) Association of the adrenergic alpha2A receptor gene with methylphenidate improvement of inattentive symptoms in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry* 64(2):218–224
  44. Prestes AP, Marques FZ, Hutz MH et al (2007) Tobacco smoking and the ADRA2A C-1291G polymorphism. *J Neural Transm* 114(11):1503–1506
  45. Prince J (2008) Catecholamine dysfunction in attention-deficit/hyperactivity disorder: an update. *J Clin Psychopharmacol* 28(3 Suppl 2):S39–S45
  46. Roman T, Polanczyk GV, Zeni C et al (2006) Further evidence of the involvement of alpha-2A-adrenergic receptor gene (ADRA2A) in inattentive dimensional scores of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 11(1):8–10
  47. Roman T, Schmitz M, Polanczyk GV et al (2003) Is the alpha-2A adrenergic receptor gene (ADRA2A) associated with attention-deficit/hyperactivity disorder? *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 120(1):116–120
  48. Rösler M, Fischer R, Ammer R et al (2009) A randomised, placebo-controlled, 24-week, study of low-dose extended-release methylphenidate in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 259(2):120–129
  49. Schmitz M, Denardin D, Silva TL et al (2006) Association between alpha-2a-adrenergic receptor gene and ADHD inattentive type. *Biol Psychiatry* 60(10):1028–1033
  50. Simon V, Czobor P, Bálint S et al (2009) Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis. *Br J Psychiatry* 194(3):204–211
  51. Spencer T, Biederman J, Wilens T et al (2005) A large, double-blind, randomized clinical trial of methylphenidate in the treatment of adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57(5):456–463
  52. Spencer J, Biederman T, Wilens M et al (1996) Pharmacotherapy of attention deficit hyperactivity disorder across the lifespan. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 35:409–428
  53. Staddon S, Arranz MJ, Mancama D et al (2002) Clinical applications of pharmacogenetics in psychiatry. *Psychopharmacology* 162(1):18–23
  54. Swanson JM (1992) School-based assessments and interventions for ADD students. KC Publishing, Irvine
  55. Tamam L, Karakus G, Ozpoyraz N (2008) Comorbidity of adult attention-deficit hyperactivity disorder and bipolar disorder: prevalence and clinical correlates. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 258(7):385–393
  56. Victor MM, Grevet EH, Salgado CA et al (2009) Reasons for pretreatment attrition and dropout from methylphenidate in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: the role of comorbidities. *J Clin Psychopharmacol* 29(6):614–616
  57. Wakeno M, Kato M, Okugawa G et al (2008) The alpha 2A-adrenergic receptor gene polymorphism modifies antidepressant responses to milnacipran. *J Clin Psychopharmacol* 28(5):518–524
  58. Wechsler D (1981) WAIS-R—manual for the wechsler adult intelligence scale—revised. The Psychological Corporation, San Antonio, Texas
  59. Wilens TE (2008) Effects of methylphenidate on the catecholaminergic system in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychopharmacol* 28(3 Suppl 2):S46–S53

**Capítulo V**

---

**NO SIGNIFICANT ASSOCIATION BETWEEN GENETIC VARIANTS IN SEVEN  
CANDIDATE GENES AND RESPONSE TO METHYLPHENIDATE TREATMENT  
IN ADULT PATIENTS WITH ADHD**

**Journal of Neural Transmission (submetido – *Short Communication*)**

**No significant association between genetic variants in seven candidate genes and response to methylphenidate treatment in adult patients with ADHD**

Verônica Contini<sup>1</sup>, Marcelo M. Victor<sup>2</sup>, Guilherme P. Bertuzzi<sup>1</sup>, Carlos A.I. Salgado<sup>2</sup>, Felipe A. Picon<sup>2</sup>, Eugenio H. Grevet<sup>2</sup>, Luis A. Rohde<sup>2,3</sup>, Paulo Belmonte-de-Abreu<sup>2,3</sup>, Claiton H. D. Bau<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departament of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Adult ADHD Outpatient Clinic, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Departament of Psychiatry, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

**Correspondence:** Dr. Claiton H. D. Bau, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, Caixa Postal:15053, CEP:91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Email: claiton.bau@ufrgs.br  
Telephone: (5551) 3308-6718  
Fax: (5551) 3308-7311

## Abstract

Results from pharmacogenetic investigations of MPH response in ADHD patients are scarce, especially among adults. This study investigates the role of genetic variants in different candidate genes (*SLC6A4*, *HTR1B*, *TPH2*, *DBH*, *DRD4*, *COMT* and *SNAP25*) in the response to MPH in a sample of 165 adults. Genes were chosen due to previous evidence for an influence in ADHD susceptibility. No significant differences in allele or genotype frequencies between MPH responders and non-responders were detected. In conclusion, our findings do not support an effect of these genes in ADHD pharmacogenetics.

**Keywords:** Attention-deficit/hyperactivity disorder; Pharmacogenetics; Methylphenidate; Serotonin; Dopamine

## Introduction

Attention-deficit/ hyperactivity disorder (ADHD) is a complex and highly heritable neuropsychiatric disorder that affects children and adults worldwide. It is characterized by symptoms of inattention, impulsivity and hyperactivity to a degree that is inconsistent with normal developmental level (Purper-Ouakil et al. 2011).

There is abundant evidence that the treatment with the psychostimulant methylphenidate (MPH) is strongly efficient in attenuating ADHD symptoms in children and adults patients. Nevertheless, approximately 30% of the patients do not show a satisfactory clinical response to the treatment (Wilens 2008; Heal et al. 2009).

Pharmacogenetic investigations of MPH response in ADHD patients have focused mainly in genes of the catecholamine pathway (Kieling et al. 2010; Froehlich et al. 2010; Polanczyk et al. 2010). Although some variants have been significantly associated with the response to the treatment, the results are still not conclusive and additional studies are required. In this context, the objective of our study is to investigate the role of genetic variants in the response to MPH in a sample of adults with ADHD. We selected eleven polymorphisms in seven genes that have already been investigated in children samples: serotonin transporter (*SLC6A4*) and receptor 1B (*HTR1B*), tryptophan hidroxilase-2 (*TPH2*), dopamine beta hidroxilase (*DBH*), dopamine D4 receptor (*DRD4*), catechol-O-methyltransferase (*COMT*) and synaptosomal-associated protein 25 (*SNAP25*). All these genes present significant evidence for association with ADHD or significant heterogeneity in effect size across studies in a meta-analytic review. Therefore, they are strong candidate genes for a pharmacogenetic study (Gizer et al. 2009).

## Materials and Methods

### Subjects

The sample is composed by 165 adults with ADHD from the ADHD Outpatient Program at the Hospital de Clinicas de Porto Alegre, RS, Brazil. The

inclusion criteria were: a) Native-Brazilian of European descent; b) age 18 years or older; c) fulfillment of DSM-IV diagnostic criteria for ADHD (American Psychiatric Association 1994); and d) eligibility to immediate-release methylphenidate (IR-MPH) treatment. Exclusion criteria were the presence of: a) clinical contraindication to IR-MPH; b) any significant neurological disease (e.g., delirium, dementia, epilepsy, head trauma, multiple sclerosis); c) current or past history of psychosis; d) intelligence quotient (IQ)<70 and e) current clinically significant comorbid disorders (excluding tobacco dependence, oppositional defiant disorder (ODD) and antisocial personality disorder). The project was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Institutional Review Board (IRB) of the hospital (IRB # 00000921). All patients signed an informed consent.

The diagnostic procedures for ADHD and comorbidities in our unit have been described elsewhere (Grevet et al. 2005; Fisher et al. 2007; Kalil et al. 2008; Karam et al. 2009).

### **Pharmacological Intervention and Drug Response**

This protocol is part of a larger study on predictors of MPH treatment response, including phenotypic characteristics (Victor et al. 2009) and pharmacogenetic studies (Contini et al. 2010, 2011). A detailed description of this pharmacogenetic protocol is in Contini et al. (2011). Briefly, patients were treated with weekly increases in IR-MPH dose until symptom control or occurrence of limiting adverse effects. All patients took at least the minimum MPH dose of 0.3 mg/kg/day. The outcome measures of MPH-treatment were the Portuguese version of the Swanson, Nolan and Pelham Rating Scale-version IV (SNAP-IV) (Swanson 1992) and the Clinical Global Impression-Severity scale (CGI-S) (Guy 1976), applied at the beginning of the treatment (baseline levels) and after the 30<sup>th</sup> day of treatment.

Drug response was assessed by both categorical and dimensional approaches. The *a priori* categorical definition of response was a 30% or greater symptom reduction in SNAP-IV and a CGI-S score of two points or less. The

dimensional evaluation of drug-response was measured by the variation in SNAP-IV scores.

### **Laboratory Methods**

DNA was extracted from whole blood by an adaptation of Lahiri and Nurnberger (1991). The polymorphisms in *DRD4* (VNTR exon 3), *SLC6A4* (5-HTTLPR), *DBH* (rs1611115) and *HTR1B* (rs6296) genes were amplified using the polymerase chain reaction (PCR) conditions adapted from Roman et al. (1999), Grevet et al. (2007), Kohnke et al. (2002) and Guimarães et al. (2009), respectively. The remaining polymorphisms (*HTR1B*-rs11568817, *HTR1B*-rs13212041, *TPH2*-rs1843809, *TPH2*-rs4570625, *COMT*-rs4680, *SNAP25*-rs3746544 and *SNAP25*-rs363020) were genotyped using the Taqman SNP genotyping assays (Applied Biosystems), according to the manufacturer's recommended protocol.

### **Statistical Analysis**

The association between specific alleles or genotypes with the categorical response to MPH treatment was analyzed by logistic regression analyses. Genetic effects in the dimensional variation in SNAP-IV scores after the MPH treatment were analyzed by ANCOVA considering baseline scores as covariates. Potential confounders (demographic characteristics, IQ, ADHD subtype, comorbidities, use of concomitant medication and MPH dose) were included as covariates using a statistical definition (association with both the study factor and outcome for a  $p \leq 0.20$ ) (Maldonado and Greenland 1993). All analyses were conducted using SPSS version 18.0 software (SPSS Inc., USA).

## **Results**

The demographic and clinical characteristics of the sample are described in Table 1. According to our *a priori* categorical definition of MPH treatment response, one hundred and thirty-seven patients (83%) were classified as



responders. Twenty-eight participants (17%) failed to show a clinical response to the treatment. The characteristics of both groups (responders and non-responders) are given in Table 1.

The estimated allele frequencies for the polymorphisms in our sample are in Table 2. The genotype distribution in all polymorphisms are in Hardy-Weinberg equilibrium (all  $P > 0.10$ ). The statistical analysis for MPH response was performed between carriers vs. non-carriers of the risk allele. The specific allele or genotype tested was defined by results of previous ADHD pharmacogenetic studies or by the frequency of the rare allele.

There were no significant differences in allele or genotype frequencies between MPH responders and non-responders in any polymorphisms (Table 2). Likewise, there are no significant effects of the polymorphisms on the response to MPH evaluated through the variation between pre and post-treatment SNAP-IV scores (all  $P > 0.20$ ; data not shown).

## Discussion

This study suggests that a group of genes with strong evidence for a role in childhood ADHD is not associated with response to MPH in adults with ADHD. Except for *DBH*, all genes that we studied have already been investigated in ADHD pharmacogenetics. However, it is important to note, that almost all studies were conducted in children samples. In adults, only the *DRD4* gene was investigated and, in agreement with our results, no significant genetic effects on MPH response were detected (Kooij et al. 2008).

In general, the results from MPH pharmacogenetic studies, even in children samples, are still not conclusive, especially for *DRD4*, *COMT* and *SNAP25* genes. In these cases, there are reports of both effects and non-effects on the MPH response and more studies are needed to dissect and confirm these results. On the other hand, the results regarding the serotonergic genes are more consistent, excluding an important role of this neurotransmitter system in the response to

MPH treatment in children (Kieling et al. 2010; Froehlich et al. 2010; Polanczyk et al. 2010).

We recognize that our study present some limitations that should be taken in account. First, this is not a controlled, but a naturalistic design; we did not have a placebo group in this trial, so we did not have an internal control to correct for any effect of time. The rate of improvement of ADHD symptoms, however, was similar to those generally found in placebo-controlled studies. The second point is the minimum MPH dose of 0.3 mg/kg/day, which is considered low. Although there is evidence that it may be effective (Rösler et al. 2009), we can not rule out the possibility that some patients could require robust dosing of MPH to attain an adequate clinical response. The lack of a strictly standardized medication titration is another limitation of our study. However, the fact that all patients were treated in a comparable manner by the same experienced psychiatrist trained in our protocol minimizes, to some extent, the limitations of the approach. Another issue is the risk of a type II error. Our sample size, however, is similar to previous studies, and analyzes one of the largest samples of adults with ADHD ever presented in pharmacogenetic investigations.

In conclusion, our findings fail to support a significant role of seven relevant genes in the clinical response to MPH treatment in ADHD, at least among Brazilian adults. Together with our previous findings for the *DAT1* (Contini et al. 2010) and *ADRA2A* (Contini et al. 2011) genes, we suggest that the classical candidate genes in ADHD susceptibility do not show relevant effects on MPH response.

## **Acknowledgement**

Thanks are due to Rafael G. Karam, Katiane Silva, Paula O. G. da Silva and Eduardo Vitola for help in the sample collection of ADHD patients. CNPq – Instituto do Milênio, FIPE-HCPA, FAPERGS, DECIT/SCTIE/MS/PPSUS and PRONEX funded this study.

## **Potential Conflicts of Interest**

The ADHD Program received unrestricted educational and research supports from the following pharmaceutical companies in the last three years: Abbott, Bristol-Myers Squibb, Eli-Lilly, Janssen-Cilag, Novartis and Shire. Dr Belmonte-de-Abreu is on the speaker's bureau or is a consultant for Janssen-Cilag and Bristol-Myers Squibb. Dr Grevet is on the speaker's bureau or is a consultant for Novartis and Janssen-Cilag. Dr Rohde was on the speakers' bureau and/or acted as consultant for Eli-Lilly, Janssen-Cilag, Novartis and Shire in the last three years (less than U\$ 10,000 per year and reflecting less than 5% of his gross income per year). He also received travel awards (air tickets + hotel) for taking part of two child psychiatric meetings from Novartis and Janssen-Cilag in 2010.

## References

- American Psychiatric Association (1994) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed. American Psychiatric Association, Washington, DC
- Contini V, Victor MM, Marques FZ, Bertuzzi GP, Salgado CA, Silva KL, Sousa NO, Grevet EH, Belmonte-de-Abreu P, Bau CH (2010) Response to methylphenidate is not influenced by DAT1 polymorphisms in a sample of Brazilian adult patients with ADHD. *J Neural Transm* 117(2):269-276
- Contini V, Victor MM, Cerqueira CC, Polina ER, Grevet EH, Salgado CA, Karam RG, Vitola ES, Belmonte-de-Abreu P, Bau CH (2011) Adrenergic  $\alpha$ 2A receptor gene is not associated with methylphenidate response in adults with ADHD. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 261(3):205-211
- Fischer AG, Bau CHD, Grevet EH, Salgado CA, Victor MM, Kalil KL, Sousa NO, Garcia CR, Belmonte-de-Abreu P (2007) The role of comorbid major depressive disorder in the clinical presentation of adult ADHD. *J Psychiatr Res* 41:991-996
- Froehlich TE, McGough JJ, Stein MA (2010) Progress and promise of attention-deficit hyperactivity disorder pharmacogenetics. *CNS Drugs* 1;24(2):99-117
- Gizer IR, Ficks C, Waldman ID (2009) Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet* 126(1):51-90
- Grevet EH, Bau CHD, Salgado CA, Fischer A, Victor MM, Garcia C, Sousa NO, Nerung L, Belmonte-de-Abreu (2005) Interrater reliability for diagnosis in adults of attention deficit hyperactivity disorder and oppositional defiant disorder using K-SADS-E. *Arq Neuropsiquiatr* 63:307-310
- Grevet EH, Marques FZ, Salgado CA, Fischer AG, Kalil KL, Victor MM, Garcia CR, Sousa NO, Belmonte-de-Abreu P, Bau CH (2007) Serotonin transporter gene polymorphism and the phenotypic heterogeneity of adult ADHD. *J Neural Transm* 114(12):1631-1636
- Guimarães AP, Schmitz M, Polanczyk GV, Zeni C, Genro J, Roman T, Rohde LA, Hutz MH (2009) Further evidence for the association between attention deficit/hyperactivity disorder and the serotonin receptor 1B gene. *J Neural Transm* 116(12):1675-1680

- Guy W (1976) ECDU Assessment Manual for Psychopharmacology, Revised. Bethesda, MD: US Department of Health, Education and Welfare
- Heal DJ, Cheetham SC, Smith SL (2009) The neuropharmacology of ADHD drugs in vivo: insights on efficacy and safety. *Neuropharmacology* 57(7-8):608-618
- Kalil KL, Bau CH, Grevet EH, Sousa NO, Garcia CR, Victor MM, Fischer AG, Salgado CA, Belmonte-de-Abreu P (2008) Smoking is associated with lower performance in WAIS-R Block Design scores in adults with ADHD. *Nicotine Tob Res* 10(4):683-688
- Karam RG, Bau CH, Salgado CA, Kalil KL, Victor MM, Sousa NO, Vitola ES, Picon FA, Zeni GD, Rohde LA, Belmonte-de-Abreu P, Grevet EH (2009) Late-onset ADHD in adults: milder, but still dysfunctional. *J Psychiatr Res* 43(7):697-701
- Kieling C, Genro JP, Hutz MH, Rohde LA (2010) A current update on ADHD pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 11(3):407-419
- Kohnke MD, Zabetian CP, Anderson GM, Kolb W, Gaertner I, Buchkremer G, Vonthein R, Schick S, Lutz U, Kohnke AM, Cubells JF (2002) A genotype-controlled analysis of plasma dopamine beta-hydroxylase in healthy and alcoholic subjects: evidence for alcohol-related differences in noradrenergic function. *Biol Psychiatry* 52:1151–1158
- Kooij JS, Boonstra AM, Vermeulen SH, Heister AG, Burger H, Buitelaar JK, Franke B (2008) Response to methylphenidate in adults with ADHD is associated with a polymorphism in SLC6A3 (DAT1). *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 5;147B(2):201-208
- Lahiri DK, Nurnberger JI Jr (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 11:5444
- Maldonado G, Greenland S (1993) Simulation study of confounder-selection strategies. *Am J Epidemiol* 1;138(11):923-936
- Polanczyk G, Bigarella MP, Hutz MH, Rohde LA (2010) Pharmacogenetic approach for a better drug treatment in children. *Curr Pharm Des* 16(22):2462-2473

- Purper-Ouakil D, Ramoz N, Lepagnol-Bestel AM, Gorwood P, Simonneau M (2011) Neurobiology of attention deficit/hyperactivity disorder. *Pediatr Res* 69(5 Pt 2):69R-76R
- Roman T, Bau CH, Almeida S, Hutz MH (1999) Lack of association of the dopamine D4 receptor gene polymorphism with alcoholism in a Brazilian population. *Addict Biol* 4(2):203-207.
- Rösler M, Fischer R, Ammer R, Ose C, Retz W (2009) A randomised, placebo-controlled, 24-week, study of low-dose extended-release methylphenidate in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 259(2):120-129
- Swanson JM (1992) School-based assessments and interventions for ADD students. KC Publishing, Irvine
- Victor MM, Grevet EH, Salgado CA, Silva KL, Sousa NO, Karam RG, Vitola ES, Picon FA, Zeni GD, Contini V, Rohde LA, Belmonte-de-Abreu P, Bau CH (2009) Reasons for pretreatment attrition and dropout from methylphenidate in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: the role of comorbidities. *J Clin Psychopharmacol* 29(6):614-616
- Wilens TE (2008) Effects of methylphenidate on the catecholaminergic system in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychopharmacol* 28(3 Suppl 2):S46-S53

**Table 1: Demographic and clinical characteristics of the sample according to MPH response**

Characteristic	Total N=165	Responders N=137	Non-responders N=28	P*
Age, median ( $\pm$ SD)	35 ( $\pm$ 11)	34 ( $\pm$ 11)	37 ( $\pm$ 11)	0.18
Sex: Male, N (%)	90 (54.5)	71 (51.8)	19 (67.9)	0.12
IQ, median ( $\pm$ SD) <sup>a</sup>	101.6 (9.5)	101.7 (9.9)	101.4 (8.1)	0.91
ADHD subtype, N (%) <sup>b</sup>				
Combined	92 (56.1)	79 (57.7)	13 (48.2)	0.60
Inattentive	64 (39.0)	52 (37.9)	12 (44.4)	
Hyperactive	8 (4.9)	6 (4.4)	2 (7.4)	
Lifetime comorbid conditions, N (%) <sup>b</sup>				
Any bipolar disorder	18 (11.0)	15 (11.0)	3 (10.7)	1.00
Major depression	50 (30.5)	46 (33.8)	4 (14.3)	0.04
Generalized anxiety disorder	19 (11.6)	16 (11.8)	3 (10.7)	1.00
Oppositional defiant disorder	57 (43.8)	48 (35.3)	9 (32.1)	0.75
Alcohol dependence	9 (5.5)	6 (4.4)	3 (10.7)	0.18
Nicotine use	72 (43.9)	62 (45.6)	10 (35.7)	0.34
SNAP-IV baseline scores, median ( $\pm$ SD)				
Total	1.71 ( $\pm$ 0.52)	1.73 ( $\pm$ 0.51)	1.61 ( $\pm$ 0.52)	0.26
Inattentive	1.86 ( $\pm$ 0.54)	1.87 ( $\pm$ 0.53)	1.81 ( $\pm$ 0.62)	0.57
Hyperactivity-impulsivity	1.56 ( $\pm$ 0.71)	1.59 ( $\pm$ 0.70)	1.41 ( $\pm$ 0.73)	0.22
Oppositional	0.85 ( $\pm$ 0.63)	0.85 ( $\pm$ 0.64)	0.85 ( $\pm$ 0.58)	0.98
CGI-S baseline scores, median ( $\pm$ SD)	4.50 ( $\pm$ 0.72)	4.56 ( $\pm$ 0.74)	4.21 ( $\pm$ 0.57)	0.02
Concomitant use of medication, N (%)	22 (13.3)	17 (12.4)	5 (17.9)	0.54
MPH dose, mg/kg median ( $\pm$ SD)				
At baseline	0.15 ( $\pm$ 0.06)	0.15 ( $\pm$ 0.06)	0.14 ( $\pm$ 0.06)	0.69
At endpoint	0.52 ( $\pm$ 0.20)	0.51 ( $\pm$ 0.21)	0.53 ( $\pm$ 0.16)	0.69
SERS baseline score, median ( $\pm$ SD) <sup>c</sup>	38.37 ( $\pm$ 23.55)	36.75 ( $\pm$ 22.91)	45.83 ( $\pm$ 25.68)	0.14

MPH, methylphenidate hydrochloride; SD, standard deviation; IQ, intelligence coefficient; ADHD, attention/deficit-hyperactivity disorder; SNAP-IV, Swanson, Nolan, and Pelham Scale version IV; CGI-S, Clinical Global Impression, Severity scale; SERS, Barkley Effect Rating scale

\* Responders and non-responders were compared using the chi-square (categorical variables) or the ANOVA test (continuous variables)

<sup>a</sup> Total N=140; Responders N=115, Non-responders N=25

<sup>b</sup> One patient with missing information

<sup>c</sup> Total N=101; Responders N=83, Non-responders N=18

This table was originally published in Contini et al. (2011)

**Table 2: Association of candidate gene polymorphisms and categorical response to MPH**

Gene/ Polymorphism	Allele frequencies	Genotype	Responders N (%)	Non-responders N (%)	P*
<i>HTR1B</i> / rs11568817	T (0.51)/ G (0.49)	Presence allele G	93 (71.0)	20 (76.9)	0.87 <sup>a,b</sup>
<i>HTR1B</i> / rs6296	G (0.74)/ C (0.26)	Presence allele G	117 (92.1)	24 (92.3)	0.87 <sup>c</sup>
<i>HTR1B</i> / rs13212041	A (0.83)/ G (0.17)	Homozygous A	95 (70.9)	18 (66.7)	0.82 <sup>b,d</sup>
<i>SLC6A4</i> / 5-HTTLPR	L (0.57)/ S (0.43)	Presence allele S	94 (71.8)	19 (70.4)	0.81 <sup>c</sup>
<i>TPH2</i> / rs1843809	T (0.84)/ G (0.16)	Homozygous T	93 (68.4)	23 (82.1)	0.17 <sup>c</sup>
<i>TPH2</i> / rs4570625	G (0.75)/ T (0.25)	Presence allele T	58 (44.6)	13 (46.4)	0.81 <sup>b</sup>
<i>DBH</i> / rs1611115	C (0.79)/ T (0.21)	Homozygous C	81 (61.8)	17 (63.0)	0.91
<i>DRD4</i> / VNTR exon 3	4R (0.67)/ 7R (0.21)**	Presence allele 7R	52 (40.6)	9 (33.3)	0.69 <sup>c</sup>
<i>COMT</i> / rs4680	Val (0.54)/ Met (0.46)	Presence allele Met	96 (70.6)	21 (75.0)	0.26 <sup>a,d</sup>
<i>SNAP25</i> / rs3746544	T (0.66)/ G (0.34)	Homozygous T	57 (41.9)	13 (46.4)	0.68
<i>SNAP25</i> / rs363020	A (0.91)/ T (0.09)	Homozygous A	113 (83.7)	21 (75.0)	0.10 <sup>a,d</sup>

*MPH*, methylphenidate hydrochloride; *HTR1B*, serotonin 1B receptor gene; *SLC6A4*, serotonin transporter gene; *5-HTTLPR*, serotonin transporter gene-linked polymorphic region; *TPH2*, tryptophan hydroxylase-2 gene; *DBH*, dopamine beta hydroxylase gene; *DRD4*, dopamine D4 receptor gene; *VNTR*, variable number of tandem repeats; *COMT*, catechol-O-methyltransferase gene; *SNAP25*, synaptosomal-associated protein 25 gene; *CGI-S*, clinical global impression

\* Calculated by logistic regression analyses. Potential confounders considered in analyses: a) sex; b) alcohol dependence; c) age; d) baseline CGI-S

\*\* Most frequent alleles: 4-repeats and 7-repeats. Other alleles include: 2R (0.05), 3R (0.02), 5R (0.03), 6R (0.015) and 8R (0.005)



## Capítulo VI

---

### **A HAPLOTYPE ANALYSIS IS CONSISTENT WITH THE ROLE OF FUNCTIONAL *HTR1B* VARIANTS IN ALCOHOL DEPENDENCE**

**Drug and Alcohol Dependence (aceite parcial)**

Sent: Saturday, July 23, 2011 10:37 AM  
Subject: Your submission: DH-10-0338R1

Dear Dr. Claiton Bau,

I returned the revised version of your manuscript to one of the original reviewers. I am advised that your revision has greatly improved the paper. Nonetheless, the reviewer has additional suggestions that should be implemented before the paper can be considered in final form. I would like to ask you to further revise the paper to implement the reviewer's suggestions.

Please submit your revised manuscript with a detailed account of how you have addressed the comments and suggestions made, explaining the changes made to the paper. Do not send us a version using a Track Changes feature or otherwise showing the portions that were revised. This can be explained in the cover letter. In preparing your revision, please adhere as closely as possible to the Instructions to Authors. To submit a revision, go to <http://ees.elsevier.com/dad/> and log in as an Author. You will see a menu item called Submission Needing Revision. You will find your submission record there.

I hope you will be able to send me a revision in 30 days. If there will be a delay in sending a revision, please let me know.

Thank you for submitting this report to Drug and Alcohol Dependence. Assuming you can address the remaining minor concerns, we should be able to publish it.

Yours sincerely,

Deborah S. Hasin, Ph.D.  
Associate Editor  
Drug and Alcohol Dependence

**A haplotype analysis is consistent with the role of functional *HTR1B* variants  
in alcohol dependence**

Verônica Contini<sup>1</sup>, Guilherme P. Bertuzzi<sup>1</sup>, Evelise R. Polina<sup>1</sup>, Tábita Hunemeier<sup>1</sup>,  
Elisa M. Hendler<sup>1</sup>, Mara H. Hutz<sup>1</sup>, Claiton H.D. Bau<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departament of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

**Correspondence:** Dr. Claiton H. D. Bau, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, Caixa Postal:15053, CEP:91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Email: claiton.bau@ufrgs.br

Telephone: (5551) 3308-6718

Fax: (5551) 3308-7311

Number of words: 2045

## Abstract

Animal and human studies have suggested that the serotonergic system plays an important role in alcohol consumption and abuse, mainly due to the serotonin receptor 1B (5-HT<sub>1B</sub>) function in the mesolimbic reward pathway. Association studies between the *HTR1B* gene variants and alcoholism have found significant results. There is also evidence for a complex balancing regulation of the gene by two functional variants in the promoter region (rs11568817 and rs130058), which are in linkage disequilibrium. The aim of this study is to investigate the role of the most relevant variants (rs11568817, rs130058, rs6296 and rs13212041) of the *HTR1B* gene in the susceptibility to alcohol dependence. The sample comprised 136 Brazilian alcoholics of European descent and 237 controls. The results suggest an association between a functional variant of the gene (rs11568817) and alcohol dependence ( $p=0.001$ ). The pattern of distribution of haplotypes was significantly different between patients and controls ( $p<0.0001$ ), which is consistent with the role of the two functional variants of the promoter region. In conclusion, our findings point to an association between functional variants in the promoter region of the *HTR1B* gene and alcohol dependence, supporting previous neurobiological evidences of the involvement of *HTR1B* variations in alcohol-related phenotypes.

**Key words:** alcoholism; *HTR1B* gene; association study; haplotype analysis

## 1. Introduction

Alcohol dependence is a common and clinically heterogeneous disease, frequently comorbid with many other mental illnesses (Hartz and Bierut, 2010). It is widely accepted that both genetic and environmental factors influence the etiology of alcohol dependence, and several epidemiological studies have estimated the heritability as around 64% (Tyndale, 2003). Although the results of genome-wide association studies for alcoholism have not revealed strong findings (Edenberg et al., 2010; Treutlein et al., 2009), the candidate gene approach may still provide significant findings since the polymorphisms and haplotypes studied may be carefully chosen based on a hypothesis-oriented approach. Although there is strong evidence that alcohol metabolism-related genes play a part in alcohol dependence, these genes account for only a small proportion of the genetic variance (Hartz and Bierut, 2010; Huang, 2010; Ösby et al., 2010). Therefore, several efforts to identify other genetic variants associated with the susceptibility to alcoholism have been focusing on genes involved in the neurotransmitter regulation (Huang, 2010; McHugh et al., 2010).

The serotonergic system plays an important role in the rewarding and reinforcing properties of alcohol consumption, mainly due to the serotonin receptor 1B (5-HT<sub>1B</sub>) (Koob, 2009). In rats, the overexpression of 5-HT<sub>1B</sub> receptors on nucleus accumbens projection neurons is associated with increased ethanol consumption (Furay et al., 2010; Hoplight et al., 2006). In humans, a neuroimaging study suggested that alcoholics have increased 5-HT<sub>1B</sub> receptors in the ventral striatum, including the globus pallidus and the nucleus accumbens, when compared with healthy control subjects (Hu et al., 2010). It is noteworthy that these brain regions are part of the mesolimbic reward pathway, which is relevant in alcohol consumption and abuse.

Most of the association studies between the serotonin receptor 1B gene (*HTR1B*) and alcohol dependence in humans focused on a synonymous single nucleotide polymorphism (SNP), rs6296 (G861C), and the first association study reported an overrepresentation of the rs6296-C allele in antisocial alcoholic subjects (Lappalainen et al., 1998). Although there have been some replications

since this initial study (Hasegawa et al., 2002; Soyka et al., 2004), other studies have provided inconsistent findings (Fehr et al., 2000; Hill et al., 2002; Huang et al., 2003). Huang et al. (1999) observed that the binding to 5-HT<sub>1B</sub> in postmortem brain prefrontal cortex is slightly increased in subjects homozygous for the rs6296-G allele, but no direct functional effects of this polymorphism have been identified. It is possible that another variant in linkage disequilibrium (LD) with rs6296 is the underlying mechanism for the alteration in binding to 5-HT<sub>1B</sub> associated with rs6296.

Although the human *HTR1B* is a short (1137pb) and intronless gene, it contains several polymorphisms in the coding sequence and surrounding 5'- and 3'-untranslated regions (UTRs) (Sanders et al., 2002). Sun et al. (2002) found an association between the rs130058 (A-161T) variant, located in the 5'UTR, and alcohol dependence in Taiwanese Han. Expression studies suggest that this variant affect the reporter gene activity (Sun et al., 2002) and point towards a complex balancing regulation of the *HTR1B* gene by two functional variants in the promoter region, rs130058 and rs11568817 (T-261G) (Duan et al., 2003). The linkage disequilibrium between rs130058, rs11568817 and rs6296 polymorphisms (Duan et al., 2003; Proudnikov et al., 2006) may explain the previous findings with the rs6296 variant.

Currently, there is evidence that at least one polymorphism in the 3'UTR of the *HTR1B* gene may also be a modulator of gene expression. Jensen et al. (2009) have identified a variant rs13212041 (A1997G) that seems to be a target for repression by microRNA-direct silencing. In this case, the inclusion of this polymorphism in haplotype studies could extend the understanding of the functional variation within the *HTR1B* gene. Two *HTR1B* haplotype association studies were performed in alcohol dependence, with negative results (Kranzler et al., 2002; Sinha et al., 2003). In both cases, three polymorphisms were included (rs11568817, rs6298 and rs6296) but rs130058 and rs13212041 were not included.

In this study we investigated the possible role of a set of four *HTR1B* polymorphisms (rs11568817, rs130058, rs6296 and rs13212041) in the susceptibility to alcohol dependence. This is the largest representation of *HTR1B*

genetic variation ever included in haplotype-based association studies in alcoholism.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Subjects**

The alcohol dependence sample is composed of 136 Brazilian males interviewed in an alcoholism treatment ward. The mean age is 41.15 ( $\pm 9.78$ ) and the mean educational level is 6.55 ( $\pm 3.37$ ) years of formal schooling. The diagnosis process followed the DSM-IV criteria (American Psychiatric Association, 2000), and the interview for alcohol dependence and lifetime comorbidities was performed with the Semi-Structured Assessment for the Genetics in Alcoholism (SSAGA) (Bucholz et al., 1994). The treatment ward receives patients with a severe dependence and frequent comorbid psychopathology. Forty-seven (34.5%) patients presented major depressive disorder and 21 (15.4%) antisocial personality disorder. Twenty-one (15.4%) attempted suicide and 52 (38.2%) had suicide ideation. Illegal drug abuse (mostly marijuana, followed by cocaine) was present in 30 (22%) individuals and nicotine dependence in 121 (88.9%).

The control group for allele and genotype frequencies is composed of 237 Brazilian replacement blood donor males assessed in a blood bank. The mean age of this sample is 34.01 ( $\pm 10.13$ ). Exposure to alcohol was measured by the CAGE questionnaire (Ewing, 1984). This instrument is a combination of four questions for the screening (but not definitive diagnosis) of alcoholism. A total of two or more positive answers suggest alcohol abuse or dependence. Although 8% of the individuals sampled answered positively to two items, none of them was probable alcohol dependent considering their alcohol drinking patterns.

All individuals included in this study (patients and controls) are Brazilians of European descent ascertained in Porto Alegre, the capital of Rio Grande do Sul, the Southernmost state of Brazil. The degree of African admixture in this European-derived population is smaller than in other Brazilian states and has been estimated as approximately 6% (Zembrzuski et al., 2006). Considering the lack of

population structure among the European descendents from the state of Rio Grande do Sul (Zembrzuski et al., 2006), specifically in Porto Alegre (Santos et al., 2010), population stratification is unlikely (Hutchison et al., 2004). Accordingly, the allele frequencies of several genes studied in this control group are equivalent to those of other European control samples (Contini et al., 2006; Freire et al., 2005, 2006; Marques et al., 2006; Polina et al., 2009; Prestes et al., 2007a, b).

All subjects signed an informed consent approved by the Ethics Committees of the Hospital and the Federal University of Rio Grande do Sul.

## **2.2 Laboratory Methods**

The DNA was extracted from whole blood by an adaptation of the method of Lahiri and Nurnberger (1991). The *HTR1B* rs11568817, rs130058 and rs6296 polymorphisms were amplified using the polymerase chain reaction (PCR) conditions adapted from Guimarães et al. (2009). The rs13212041 variant was genotyped using the Taqman SNP genotyping assays (Applied Biosystems), according the manufacturer's recommended protocol.

## **2.3 Statistical Analyses**

The characterization of the LD and the estimation of haplotypes comprising the *HTR1B* polymorphisms were performed with the MLOCUS program (Long et al., 1995, 1999). The analyses of Hardy-Weinberg equilibrium, differences in allele, genotype and haplotype frequencies between patients and controls and the presence of comorbidities were analyzed by the chi-square test. The haplotype analysis was restricted to haplotypes with frequency  $\geq 0.05$ .

All analyses were conducted using SPSS version 12.0 software (SPSS Inc., USA). The Bonferroni procedure was applied considering the pattern of correlations between the variables included in the study, since independence between variables is an assumption for such corrections. The variance in the "outcome" variables could be ascribed to three main factors: (a) alcohol dependence case-control; (b) presence of internalizing comorbidities (major depressive disorder) and (c) presence of externalizing comorbidities (illegal drug abuse, nicotine dependence and antisocial personality disorder). Considering that



all *HTR1B* polymorphisms are in strong LD, there were two genetic variables (genotypes and haplotypes). Therefore, the number of independent comparisons to correct for was 6 and the p value set at 0.008.

### 3. Results

Allele and genotype frequencies of the *HTR1B* polymorphisms in patients and controls are presented in Table 1. The genotype distributions among the samples did not deviate from the values expected according to Hardy-Weinberg equilibrium in any polymorphism analyzed (all  $p > 0.2$ ). We observed a significant difference in the genotype and allele frequencies of the rs11568817 polymorphism between patients and controls (Genotype  $\chi^2 = 14.33$ ,  $p = 0.001$ ; Allele  $\chi^2 = 12.19$ ,  $p < 0.0001$ ). The chi-square residual analysis revealed a higher frequency of the – rs11568817-G allele among patients with alcohol dependence. No significant differences in allele and genotype frequencies between patients and controls were found in the other *HTR1B* polymorphisms (rs130058, rs6296 and rs13212041).

The haplotype analysis revealed that the rs11568817, rs130058, rs6296 and rs13212041 polymorphisms are in strong LD in patients and controls. The pairwise LD estimates for patients were as follow: rs11568817/rs130058 –  $D' = 1.00$ ,  $r^2 = 0.27$ ,  $p < 0.0001$ ; rs11568817/rs6296 –  $D' = 0.59$ ,  $r^2 = 0.20$ ,  $p < 0.0001$ ; rs11568817/rs13212041 –  $D' = 0.41$ ,  $r^2 = 0.06$ ,  $p < 0.0001$ ; rs130058/rs6296 –  $D' = 1.00$ ,  $r^2 = 0.15$ ,  $p < 0.0001$ ; rs130058/rs13212041 –  $D' = 1.00$ ,  $r^2 = 0.09$ ,  $p < 0.0001$ ; rs6296/rs13212041 –  $D' = 1.00$ ,  $r^2 = 0.11$ ,  $p < 0.0001$ .  $D'$  values in the control group ranged from 0.87 to 0.97 (all  $p < 0.0001$ ).

Patients and controls presented significant differences in the estimated haplotype frequencies (Table 2). The chi-square residual analysis revealed two specific haplotypes that are more frequent in patients (G/A/G/G and G/A/C/A, for rs11568817, rs130058, rs6296 and rs13212041, respectively) ( $p < 0.0001$ ).

None of the comorbid disorders investigated, major depressive disorder, antisocial personality disorder, illegal drug abuse and nicotine dependence were associated to the *HTR1B* polymorphisms or haplotypes (all  $p > 0.10$ ).

## 4. Discussion

This study provides further evidence for the interplay of different *HTR1B* polymorphisms in the susceptibility to alcohol dependence. The results are consistent with previous positive association findings between *HTR1B* and alcoholism (Hasegawa et al., 2002; Lappalainen et al., 1998; Lee et al., 2009; Soyka et al., 2004; Sun et al., 2002). The new and interesting finding observed here is the association between alcohol dependence and the G allele of the *HTR1B* rs11568817 polymorphism. This association could also be confirmed in an independent sample using imputed data (Frank et al., 2011, personal communication; for description of study sample see Treutlein et al., 2009), where marginal significant association ( $p=0.03$ , one-tailed) with the same allele was obtained. Supporting this finding, the haplotype analysis revealed two haplotypes containing the rs11568817-G allele that are significantly more frequent in alcohol dependent subjects. These results remained significant even after Bonferroni correction for multiple tests.

The rs11568817-G allele is associated with an enhanced transcriptional activity but its effect could be reverted by another functional variant in the promoter segment (rs130058). In fact, the net functional effect on transcription is null when the rs11568817-G and rs130058-T alleles are in the same haplotype (Duan et al., 2003). In our sample, both haplotypes associated with alcohol dependence (G/A/G/G and G/A/C/A) contain the GA pairing at the positions rs11568817 and rs130058 and thus could be classified as higher activity haplotypes. A third haplotype containing the GA pairing (G/A/G/A) is also more frequent in the alcoholic sample, although this difference is not statistically significant considering the residual analysis. The remaining haplotypes, which could be classified as lower activity, are more frequent in the control sample. Therefore, as a whole, our results point to an association between functional variants in the promoter region of the *HTR1B* gene and alcohol dependence.

The association found in this study between a high-activity variant of the *HTR1B* gene and alcohol dependence is consistent with the hypothesis that 5-HT<sub>1B</sub> receptors indirectly enhance dopaminergic tone in the mesolimbic reward

pathway through the inhibition of GABAergic neurotransmission (Furay et al., 2010). Genetic variants associated with enhanced *HTR1B* transcription could in this way be a susceptibility factor to alcoholism.

The present association finding based on a relatively small sample size should be interpreted with caution, at least until a sufficient number of additional studies allow the performance of a meta-analysis of association studies between *HTR1B* polymorphisms and alcoholism. These additional studies should be performed both in additional samples of the same population and in other populations. The strength of the finding is that it adds to previous neurobiological evidences that *HTR1B* variations are involved in alcohol dependence (Hu et al., 2010; Koob, 2009). Despite the lack of robust findings in genome-wide association studies, the relevance of alcohol dependence in public health demands the individual and analytical consideration of all plausible candidate genes. In this way, the small effect size attributable to alcohol metabolism genes does not mean that they are irrelevant in alcohol dependence. On the contrary, they help to understand the pathophysiology of the disorder. In conclusion, our findings support the involvement of the *HTR1B* gene in the liability to alcohol dependence and suggest that more studies should be conducted in this topic.

## **Acknowledgements**

We thank the GESGA consortium (Frank et al. 2011, personal communication) for providing data of an independent study on alcohol dependence for replication purposes.

## References

- American Psychiatric Association, 2000. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Washington, DC.
- Bucholz, K. K., Cadoret, R., Cloninger, C. R., Dinwiddie, S. H., Hesselbrock, V. M., Nurnberger, J. I., Jr., Reich, T., Schmidt, I., Schuckit, M. A., 1994. A new, semi-structured psychiatric interview for use in genetic linkage studies: a report on the reliability of the SSAGA. *J Stud Alcohol*. 55, 149-158.
- Contini, V., Marques, F. Z., Garcia, C. E., Hutz, M. H., Bau, C. H., 2006. MAOA-uVNTR polymorphism in a Brazilian sample: further support for the association with impulsive behaviors and alcohol dependence. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 141B, 305-308.
- Duan, J., Sanders, A. R., Molen, J. E., Martinolich, L., Mowry, B. J., Levinson, D. F., Crowe, R. R., Silverman, J. M., Gejman, P. V., 2003. Polymorphisms in the 5'-untranslated region of the human serotonin receptor 1B (HTR1B) gene affect gene expression. *Mol Psychiatry*. 8, 901-910.
- Edenberg, H. J., Koller, D. L., Xuei, X., Wetherill, L., McClintick, J. N., Almasy, L., Bierut, L. J., Bucholz, K. K., Goate, A., Aliev, F., Dick, D., Hesselbrock, V., Hinrichs, A., Kramer, J., Kuperman, S., Nurnberger, J. I., Jr., Rice, J. P., Schuckit, M. A., Taylor, R., Todd Webb, B., Tischfield, J. A., Porjesz, B., Foroud, T., 2010. Genome-wide association study of alcohol dependence implicates a region on chromosome 11. *Alcohol Clin Exp Res*. 34, 840-852.
- Ewing, J. A., 1984. Detecting alcoholism. The CAGE questionnaire. *Jama*. 252, 1905-1907.
- Fehr, C., Grintschuk, N., Szegedi, A., Anghelescu, I., Klawe, C., Singer, P., Hiemke, C., Dahmen, N., 2000. The HTR1B 861G>C receptor polymorphism among patients suffering from alcoholism, major depression, anxiety disorders and narcolepsy. *Psychiatry Res*. 97, 1-10.
- Freire, M. T., Hutz, M. H., Bau, C. H., 2005. The DBH -1021 C/T polymorphism is not associated with alcoholism but possibly with patients' exposure to life events. *J Neural Transm*. 112, 1269-1274.

- Freire, M. T., Marques, F. Z., Hutz, M. H., Bau, C. H., 2006. Polymorphisms in the DBH and DRD2 gene regions and smoking behavior. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 256, 93-97.
- Furay, A. R., Neumaier, J. F., Mullenix, A. T., Kaiyala, K. K., Sandygren, N. K., Hoplight, B. J., 2010. Overexpression of 5-HT(1B) mRNA in nucleus accumbens shell projection neurons differentially affects microarchitecture of initiation and maintenance of ethanol consumption. *Alcohol.*
- Guimaraes, A. P., Schmitz, M., Polanczyk, G. V., Zeni, C., Genro, J., Roman, T., Rohde, L. A., Hutz, M. H., 2009. Further evidence for the association between attention deficit/hyperactivity disorder and the serotonin receptor 1B gene. *J Neural Transm.* 116, 1675-1680.
- Hartz, S. M., Bierut, L. J., 2010. Genetics of addictions. *Psychiatr Clin North Am.* 33, 107-124.
- Hasegawa, Y., Higuchi, S., Matsushita, S., Miyaoka, H., 2002. Association of a polymorphism of the serotonin 1B receptor gene and alcohol dependence with inactive aldehyde dehydrogenase-2. *J Neural Transm.* 109, 513-521.
- Hill, E. M., Stoltenberg, S. F., Bullard, K. H., Li, S., Zucker, R. A., Burmeister, M., 2002. Antisocial alcoholism and serotonin-related polymorphisms: association tests. *Psychiatr Genet.* 12, 143-153.
- Hoplight, B. J., Sandygren, N. A., Neumaier, J. F., 2006. Increased expression of 5-HT1B receptors in rat nucleus accumbens via virally mediated gene transfer increases voluntary alcohol consumption. *Alcohol.* 38, 73-79.
- Hu, J., Henry, S., Gallezot, J. D., Ropchan, J., Neumaier, J. F., Potenza, M. N., Sinha, R., Krystal, J. H., Huang, Y., Ding, Y. S., Carson, R. E., Neumeister, A., 2010. Serotonin 1B receptor imaging in alcohol dependence. *Biol Psychiatry.* 67, 800-803.
- Huang, C. L., 2010. The role of serotonin and possible interaction of serotonin-related genes with alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase genes in alcohol dependence-a review. *Am J Transl Res.* 2, 190-199.
- Huang, Y. Y., Grailhe, R., Arango, V., Hen, R., Mann, J. J., 1999. Relationship of psychopathology to the human serotonin1B genotype and receptor binding kinetics in postmortem brain tissue. *Neuropsychopharmacology.* 21, 238-246.

- Huang, Y. Y., Oquendo, M. A., Friedman, J. M., Greenhill, L. L., Brodsky, B., Malone, K. M., Khait, V., Mann, J. J., 2003. Substance abuse disorder and major depression are associated with the human 5-HT<sub>1B</sub> receptor gene (HTR1B) G861C polymorphism. *Neuropsychopharmacology*. 28, 163-169.
- Hutchison, K. E., Stallings, M., McGeary, J., Bryan, A., 2004. Population stratification in the candidate gene study: fatal threat or red herring? *Psychol Bull*. 130, 66-79.
- Jensen, K. P., Covault, J., Conner, T. S., Tennen, H., Kranzler, H. R., Furneaux, H. M., 2009. A common polymorphism in serotonin receptor 1B mRNA moderates regulation by miR-96 and associates with aggressive human behaviors. *Mol Psychiatry*. 14, 381-389.
- Koob, G. F., 2009. Dynamics of neuronal circuits in addiction: reward, antireward, and emotional memory. *Pharmacopsychiatry*. 42 Suppl 1, S32-41.
- Kranzler, H. R., Hernandez-Avila, C. A., Gelernter, J., 2002. Polymorphism of the 5-HT<sub>1B</sub> receptor gene (HTR1B): strong within-locus linkage disequilibrium without association to antisocial substance dependence. *Neuropsychopharmacology*. 26, 115-122.
- Lahiri, D. K., Nurnberger, J. I., Jr., 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*. 19, 5444.
- Lappalainen, J., Long, J. C., Eggert, M., Ozaki, N., Robin, R. W., Brown, G. L., Naukkarinen, H., Virkkunen, M., Linnoila, M., Goldman, D., 1998. Linkage of antisocial alcoholism to the serotonin 5-HT<sub>1B</sub> receptor gene in 2 populations. *Arch Gen Psychiatry*. 55, 989-994.
- Lee, S. Y., Lin, W. W., Huang, S. Y., Kuo, P. H., Wang, C. L., Wu, P. L., Chen, S. L., Wu, J. Y., Ko, H. C., Lu, R. B., 2009. The relationship between serotonin receptor 1B polymorphisms A-161T and alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res*. 33, 1589-1595.
- Long, J. C., Williams, R. C., Urbanek, M., 1995. An E-M algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes. *Am J Hum Genet*. 56, 799-810.
- Long, J. C., 1999. Multiple locus haplotype analysis, version 3.0. Software and documentation distributed by the author. Department of Human Genetics,

- University of Michigan Medical School, 4909 Buhl Bldg., Ann Arbor, MI 4819-0618.
- Marques, F. Z., Hutz, M. H., Bau, C. H., 2006. Influence of the serotonin transporter gene on comorbid disorders among alcohol-dependent individuals. *Psychiatr Genet.* 16, 125-131.
- McHugh, R. K., Hofmann, S. G., Asnaani, A., Sawyer, A. T., Otto, M. W., 2010. The serotonin transporter gene and risk for alcohol dependence: a meta-analytic review. *Drug Alcohol Depend.* 108, 1-6.
- Ösby, U., Liljenberg, J., Kockum, I., Gunnar, A., Terenius, L., 2010. Genes and alcohol. *Eur Psychiatry.* 25, 281-283.
- Polina, E. R., Contini, V., Hutz, M. H., Bau, C. H., 2009. The serotonin 2A receptor gene in alcohol dependence and tobacco smoking. *Drug Alcohol Depend.* 101, 128-131.
- Prestes, A. P., Marques, F. Z., Hutz, M. H., Bau, C. H., 2007a. The GNB3 C825T polymorphism and depression among subjects with alcohol dependence. *J Neural Transm.* 114, 469-472.
- Prestes, A. P., Marques, F. Z., Hutz, M. H., Roman, T., Bau, C. H., 2007b. Tobacco smoking and the ADRA2A C-1291G polymorphism. *J Neural Transm.* 114, 1503-1506.
- Proudnikov, D., LaForge, K. S., Hofflich, H., Levenstien, M., Gordon, D., Barral, S., Ott, J., Kreek, M. J., 2006. Association analysis of polymorphisms in serotonin 1B receptor (HTR1B) gene with heroin addiction: a comparison of molecular and statistically estimated haplotypes. *Pharmacogenet Genomics.* 16, 25-36.
- Sanders, A. R., Duan, J., Gejman, P. V., 2002. DNA variation and psychopharmacology of the human serotonin receptor 1B (HTR1B) gene. *Pharmacogenomics.* 3, 745-762.
- Santos, N. P., Ribeiro-Rodrigues, E. M., Ribeiro-Dos-Santos, A. K., Pereira, R., Gusmao, L., Amorim, A., Guerreiro, J. F., Zago, M. A., Matte, C., Hutz, M. H., Santos, S. E., 2010. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat.* 31, 184-190.

- Sinha, R., Cloninger, C. R., Parsian, A., 2003. Linkage disequilibrium and haplotype analysis between serotonin receptor 1B gene variations and subtypes of alcoholism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 121B, 83-88.
- Soyka, M., Preuss, U. W., Koller, G., Zill, P., Bondy, B., 2004. Association of 5-HT1B receptor gene and antisocial behavior in alcoholism. *J Neural Transm.* 111, 101-109.
- Sun, H. F., Chang, Y. T., Fann, C. S., Chang, C. J., Chen, Y. H., Hsu, Y. P., Yu, W. Y., Cheng, A. T., 2002. Association study of novel human serotonin 5-HT(1B) polymorphisms with alcohol dependence in Taiwanese Han. *Biol Psychiatry.* 51, 896-901.
- Treutlein, J., Cichon, S., Ridinger, M., Wodarz, N., Soyka, M., Zill, P., Maier, W., Moessner, R., Gaebel, W., Dahmen, N., Fehr, C., Scherbaum, N., Steffens, M., Ludwig, K. U., Frank, J., Wichmann, H. E., Schreiber, S., Dragano, N., Sommer, W. H., Leonardi-Essmann, F., Lourdasamy, A., Gebicke-Haerter, P., Wienker, T. F., Sullivan, P. F., Nothen, M. M., Kiefer, F., Spanagel, R., Mann, K., Rietschel, M., 2009. Genome-wide association study of alcohol dependence. *Arch Gen Psychiatry.* 66, 773-784.
- Tyndale, R. F., 2003. Genetics of alcohol and tobacco use in humans. *Ann Med.* 35, 94-121.
- Zembrzuski, V. M., Callegari-Jacques, S. M., Hutz, M. H., 2006. Application of an African Ancestry Index as a genomic control approach in a Brazilian population. *Ann Hum Genet.* 70, 822-828.



**Table 1.** Genotype and allele frequencies of the *HTR1B* polymorphisms in alcohol dependent patients and controls

Polymorphism	Alcoholics (N=136) N (%)	Controls (N=237) N (%)
<b>rs11568817</b>		
Genotypes		
TT	18 (14.1)	71 (31.0)
TG	72 (56.3)	115 (50.2)
GG	38 (29.7)	43 (18.8)
Alleles		
T	108 (0.42)	257 (0.56)
G	148 (0.58)	201 (0.44)
<b>rs130058</b>		
Genotypes		
AA	67 (52.3)	120 (50.6)
AT	53 (41.4)	96 (40.5)
TT	8 (6.3)	21 (8.9)
Alleles		
A	187 (0.73)	336 (0.71)
T	69 (0.27)	138 (0.29)
<b>rs6296</b>		
Genotypes		
GG	64 (47.8)	110 (46.6)
GC	60 (44.8)	106 (44.9)
CC	10 (7.5)	20 (8.5)
Alleles		
G	188 (0.7)	326 (0.69)
C	80 (0.3)	146 (0.31)
<b>rs13212041</b>		
Genotypes		
AA	80 (61.1)	148 (62.4)
AG	45 (34.4)	79 (33.3)
GG	6 (4.6)	10 (4.2)
Alleles		
A	205 (0.78)	375 (0.79)
G	57 (0.22)	99 (0.21)

rs11568817: Genotypes  $\chi^2=14.33$ ,  $p=0.001$ ; Alleles  $\chi^2=12.75$ ,  $p<0.001$

rs130058: Genotypes  $\chi^2=0.78$ ,  $p=0.68$ ; Alleles  $\chi^2=0.28$ ,  $p=0.60$

rs6296: Genotypes  $\chi^2=0.13$ ,  $p=0.94$ ; Alleles  $\chi^2=0.05$ ,  $p=0.82$

rs13212041: Genotypes  $\chi^2=0.08$ ,  $p=0.96$ ; Alleles  $\chi^2=0.03$ ,  $p=0.86$

**Table 2.** Haplotype frequencies of the *HTR1B* polymorphisms in alcohol-dependent patients and controls

Polymorphism				Alcoholics (N=133)	Controls (N=236)	p*
rs11568817	rs130058	rs6296	rs13212041			
T	A	G	A	0.063	0.078	0.46
T	A	G	G	0.138	0.196	0.05
T	A	C	A	0.227	0.285	0.07
T	T	C	A	-	0.005	-
T	T	C	G	-	0.002	-
G	A	G	A	0.170	0.124	0.10
G	A	G	G	0.070	0.009	<0.0001
G	A	C	A	0.068	0.016	<0.0001
G	T	G	A	0.264	0.283	0.52
G	T	C	A	-	0.002	-

Patients X controls:  $\chi^2= 44.09$  p<0.0001

\*p values obtained from  $\chi^2$  residual analysis. The haplotype analysis was restricted to haplotypes with frequency  $\geq 0.05$

**Capítulo VI**

---

---

**DISCUSSÃO**

Esse projeto foi criado tendo em mente que é essencial que se persista na busca de um tratamento farmacológico rápido e satisfatório para os pacientes com TDAH. O TDAH atinge uma parcela significativa da sociedade e representa um problema de saúde pública relevante, pois os prejuízos causados pela presença do transtorno se estendem além dos níveis individual e familiar.

O sucesso do tratamento é um dos passos fundamentais para que os pacientes com TDAH consigam romper o andamento de um processo cumulativo e agravante de prejuízos relacionados com o transtorno. Devido ao seu caráter crônico, adultos com TDAH convivem durante anos com uma série de desfechos negativos causados, muitas vezes, pela ausência de diagnóstico e/ ou de um tratamento adequado na infância. Além disso, o surgimento de novas demandas, profissionais e afetivas, por exemplo, pode resultar em um quadro mais grave na vida adulta.

Uma extensa literatura comprova, há mais de 50 anos, a eficiência do uso de estimulantes, em especial do MPH, na redução dos sintomas do TDAH. No entanto, na prática clínica, o tratamento farmacológico dos pacientes com esse transtorno ainda representa um desafio. Nesse sentido, além da questão do manejo dos pacientes que sabidamente não respondem ao MPH, dois aspectos merecem a nossa atenção: a adesão e a continuidade do tratamento. De fato, essas questões talvez representem a principal dificuldade enfrentada pelos profissionais da saúde. Ainda não conhecemos profundamente as razões que levam alguns pacientes a abandonarem o tratamento, mesmo tendo muitas vezes obtido resultados satisfatórios.

Algumas características clínicas dos pacientes com TDAH estão provavelmente influenciando o tratamento e, especialmente em pacientes adultos, este parece ser o caso das comorbidades. Nossos resultados obtidos com parte da amostra que foi utilizada neste estudo, os quais já foram abordados no capítulo I, evidenciaram um efeito importante da presença de certas comorbidades no abandono precoce do tratamento (Victor e cols. 2009). Em nossos estudos farmacogenéticos, embora os pacientes com comorbidades clinicamente significativas no momento da avaliação tenham sido excluídos das análises, podemos observar algumas tendências que sugerem uma influência da presença

de comorbidades ao longo da vida (*lifetime*) na resposta ao tratamento. No grupo de pacientes classificados como não-respondedores ao MPH, por exemplo, observamos uma frequência maior de dependência de álcool e uma frequência menor de transtorno depressivo maior, além de uma frequência também menor de uso de nicotina. Esses achados não foram estatisticamente significativos, mas podem mesmo assim ter algum significado biologicamente relevante no tratamento.

Nossos resultados, certamente, não permitem conclusões robustas sobre o efeito das comorbidades na resposta ao tratamento com MPH, mas nos permitem algumas especulações. Em relação ao uso de nicotina, por exemplo, podemos imaginar que a maior frequência observada nos pacientes que foram classificados como respondedores ao MPH poderia estar indicando um efeito da automedicação. Nesse caso, a “resposta final” ao tratamento pode não ser unicamente devido aos efeitos do MPH em si, mas também, em parte, ser influenciada pelos efeitos da nicotina. Evidentemente, a confirmação desse tipo de inferência necessita de estudos com grande tamanho amostral e delineamento adequado. O seguimento dos nossos estudos talvez possa confirmar ou refutar tais hipóteses.

Outro aspecto interessante do possível efeito das comorbidades na resposta ao tratamento está relacionado com o fato de que essas associações poderiam ajudar a explicar por que, de forma geral, os estudos farmacogenéticos realizados em adultos ainda não conseguiram detectar efeitos genéticos na resposta ao MPH, enquanto que os estudos realizados com crianças parecem mais promissores nesse sentido. Nesse caso, além do fato de adultos e crianças com TDAH exibirem um perfil de comorbidades diferente, algumas variáveis, como o uso de álcool e nicotina, por exemplo, são mais frequentes em adultos. Portanto, considerando hipoteticamente que a presença dessas comorbidades pode influenciar a resposta ao tratamento com MPH, esses efeitos serão obviamente mais marcantes nos estudos com pacientes adultos, aumentando a variabilidade dos fatores determinantes da resposta terapêutica e, com isso, dificultando a identificação do papel de alelos específicos.

De fato, a compreensão dos fatores envolvidos na resposta ao tratamento com MPH é indissociável do entendimento da neurobiologia do TDAH. Os estudos farmacogenéticos têm se deparado com um padrão de resultados bastante complexo e heterogêneo que está, possivelmente, refletindo a heterogeneidade clínica do transtorno. Por outro lado, essa heterogeneidade clínica nada mais é do que uma representação fenotípica de uma marcante heterogeneidade etiológica. Portanto, não é surpreendente que exista tanta variabilidade na resposta dos pacientes com TDAH ao tratamento com MPH, e que esteja sendo difícil determinar realmente quais fatores genéticos estão envolvidos nesse processo.

Considerando que diversas vias neurobiológicas atuam na predisposição ao TDAH, provavelmente parte da variabilidade observada no tratamento com MPH pode ser explicada pelo fato de que estamos tratando “neurobiologias” diferentes com o mesmo fármaco. Identificar as variantes genéticas que predizem uma melhor resposta ao MPH poderá ajudar a esclarecer também a neurobiologia do transtorno. Consequentemente, o melhor entendimento da neurobiologia do TDAH poderá permitir o desenvolvimento de outros fármacos para os pacientes que não se beneficiam do MPH. Nesse sentido, é essencial que se compreenda melhor o papel dos genes candidatos na heterogeneidade clínica do TDAH. Poderíamos com isso nos aproximar do objetivo primordial da farmacogenética, ao buscar o fármaco correto para o paciente correto.

Esse padrão de heterogeneidade clínica e genética do TDAH pode ser exemplificado pelos achados para o gene *ADRA2A*, que parece ter efeitos sutis, mas relevantes no transtorno e na resposta ao tratamento com MPH em indivíduos com TDAH da nossa população. Os resultados obtidos em amostras de crianças indicaram um efeito da homozigose para o alelo G do polimorfismo C-1291G na gravidade do transtorno, mais especificamente nos sintomas de desatenção (Roman e cols. 2003, 2006), e também uma associação do genótipo GG com o TDAH do subtipo desatento (Schmitz e cols. 2006). Posteriormente, investigações desse polimorfismo na resposta ao MPH, em crianças, indicaram uma associação entre a presença do alelo G e uma maior redução dos sintomas de desatenção após o tratamento (Polanczyk e cols. 2007, da Silva e cols. 2008).

Tais achados não foram observados em nossas investigações em adultos com TDAH. Entretanto, nossos resultados sugeriram uma associação entre um haplótipo no gene *ADRA2A*, que contém o alelo G do polimorfismo C-1291G, e escores mais baixos das dimensões de temperamento evitação de dano e persistência e mais elevados de busca de novidades (Cerqueira e cols. 2010). Embora nossas investigações farmacogenéticas não evidenciam nenhum efeito direto do gene, observamos uma tendência de associação entre a presença do alelo G (C-1291G) e escores mais baixos de desatenção após o tratamento com MPH, apenas nos pacientes do sexo masculino. Interessantemente, esse resultado nos homens segue a mesma direção dos resultados obtidos nas amostras de crianças, onde há predomínio de meninos, e levanta a hipótese de que o efeito do gene no tratamento poderia ser influenciado pelo sexo dos pacientes. Em conjunto, nossos resultados sugerem que características clínicas da amostra, como o perfil de temperamento e o sexo, podem influenciar o efeito do gene *ADRA2A* no TDAH.

Os resultados envolvendo a associação entre polimorfismos no gene *HTR1B* e a dependência de álcool colocam também em pauta a questão da heterogeneidade etiológica do TDAH e dos transtornos psiquiátricos em geral. Esse gene apresenta evidência de associação significativa com o TDAH (Gizer e cols. 2009), inclusive em crianças da nossa população (Guimarães e cols. 2009). Por outro lado, os estudos farmacogenéticos indicam que ele não apresenta efeitos significativos na resposta ao tratamento com MPH, nem mesmo em crianças (Zeni e cols. 2007). Embora os nossos resultados preliminares não tenham evidenciado associação entre o gene *HTR1B* com o TDAH, foi possível verificar uma associação significativa com a dependência de álcool, tanto em indivíduos da nossa população como também em uma amostra alemã. Esses dados parecem indicar um efeito relevante do gene em fenótipos interligados pelo modelo de desinibição comportamental, mencionado no Capítulo 1. Sabemos que existe uma forte associação entre o TDAH e transtornos por uso de substâncias e, provavelmente, alguns fatores genéticos de risco são compartilhados. Portanto, é plausível que esse gene esteja também influenciando de alguma maneira a

heterogeneidade clínica do TDAH. A continuidade das investigações na nossa amostra de adultos com TDAH poderá, futuramente, avaliar tais possibilidades.

Em nossas análises farmacogenéticas investigamos a influência de 17 variantes genéticas na resposta ao tratamento com MPH em adultos. A maioria dessas variantes foi selecionada com base nas evidências de efeito no transtorno em si ou na resposta ao MPH, provenientes de estudos em crianças. Nossos resultados indicaram que essas variantes não estão influenciando a resposta ao MPH em nossa amostra. Infelizmente, os estudos farmacogenéticos em adultos com TDAH são muito escassos e, portanto, não permitem as necessárias comparações. Até o momento, apenas dois estudos em pacientes adultos investigaram o efeito de polimorfismos genéticos nos genes *DAT1*, *DRD4* e *NET1* na resposta ao MPH (Mick e cols. 2006; Kooij e cols. 2008). De forma geral, os resultados não apontam nenhum efeito significativo desses genes. No entanto, há obviamente a necessidade urgente de novas investigações farmacogenéticas em adultos, principalmente em amostras maiores, e incluindo outros genes.

Embora nossas investigações farmacogenéticas incluam o maior número de pacientes adultos já avaliados nesse tipo de estudo, certamente nosso tamanho amostral ainda não permite conclusões definitivas a respeito do papel dos genes investigados na resposta ao MPH. Além disso, novas investigações também poderão avaliar mais profundamente o efeito das variáveis clínicas dos pacientes que podem influenciar a resposta ao tratamento, tais como as comorbidades, o sexo e o perfil de temperamento. A expectativa é de que estudos futuros, em amostras maiores, consigam elucidar os mecanismos genéticos envolvidos na heterogeneidade clínica do TDAH, abordando também interações gene-gene e interações gene-ambiente. Tais investigações se alinhariam na busca por melhores estratégias de tratamento para os pacientes com TDAH, seja com o uso de MPH ou de outros fármacos.



## REFERÊNCIAS

- Adler LA (2008). Epidemiology, impairments, and differential diagnosis in adult ADHD: introduction. *CNS Spectr* 13: 4-5.
- APA (2004). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, Fourth edition. American Psychiatric Association. Washington, DC.
- Arnsten AF (2009). The Emerging Neurobiology of Attention Deficit Hyperactivity Disorder: The Key Role of the Prefrontal Association Cortex. *J Pediatr* 154: 1-S43.
- Arnsten AF e Li BM (2005). Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biol Psychiatry* 57: 1377-1384.
- Arnsten AF e Pliszka SR (2011). Catecholamine influences on prefrontal cortical function: relevance to treatment of attention deficit/hyperactivity disorder and related disorders. *Pharmacol Biochem Behav* 99: 211-216.
- Barkley RA (1997). Behavioral inhibition, sustained attention, and executive functions: constructing a unifying theory of ADHD. *Psychol Bull* 121: 65-94.
- Bekker EM, Bocker KB, Van Hunsel F, van den Berg MC e Kenemans JL (2005). Acute effects of nicotine on attention and response inhibition. *Pharmacol Biochem Behav* 82: 539-548.
- Berridge CW, Devilbiss DM, Andrzejewski ME, Arnsten AF, Kelley AE, Schmeichel B, Hamilton C e Spencer RC (2006). Methylphenidate preferentially increases catecholamine neurotransmission within the prefrontal cortex at low doses that enhance cognitive function. *Biol Psychiatry* 60: 1111-1120.
- Biederman J (2004). Impact of comorbidity in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychiatry* 65 Suppl 3: 3-7.
- Biederman J (2005). Attention-deficit/hyperactivity disorder: a selective overview. *Biol Psychiatry* 57: 1215-1220.
- Biederman J, Faraone SV, Monuteaux MC, Bober M e Cadogen E (2004). Gender effects on attention-deficit/hyperactivity disorder in adults, revisited. *Biol Psychiatry* 55: 692-700.

- Biederman J, Petty CR, Clarke A, Lomedico A e Faraone SV (2011). Predictors of persistent ADHD: an 11-year follow-up study. *J Psychiatr Res* 45: 150-155.
- Biederman J, Petty CR, Evans M, Small J e Faraone SV (2010a). How persistent is ADHD? A controlled 10-year follow-up study of boys with ADHD. *Psychiatry Res* 177: 299-304.
- Biederman J, Petty CR, Monuteaux MC, Fried R, Byrne D, Mirto T, Spencer T, Wilens TE e Faraone SV (2010b). Adult psychiatric outcomes of girls with attention deficit hyperactivity disorder: 11-year follow-up in a longitudinal case-control study. *Am J Psychiatry* 167: 409-417.
- Biederman J e Spencer T (1999). Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) as a noradrenergic disorder. *Biol Psychiatry* 46: 1234-1242.
- Bodmer W e Bonilla C (2008). Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. *Nat Genet* 40: 695-701.
- Boomsma DI, Saviouk V, Hottenga JJ, Distel MA, de Moor MH, Vink JM, Geels LM, van Beek JH, Bartels M, de Geus EJ e cols. (2010). Genetic epidemiology of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD index) in adults. *PLoS One* 5: e10621.
- Bradley C (1937). The behavior of children receiving benzedrine. *Am J Psychiatry* 94: 577-585.
- Castells X, Ramos-Quiroga JA, Rigau D, Bosch R, Nogueira M, Vidal X e Casas M (2011). Efficacy of methylphenidate for adults with attention-deficit hyperactivity disorder: a meta-regression analysis. *CNS Drugs* 25: 157-169.
- Charach A, Yeung E, Climans T e Lillie E (2011). Childhood attention-deficit/hyperactivity disorder and future substance use disorders: comparative meta-analyses. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 50: 9-21.
- Chazan R, Borowski C, Pianca T, Ludwig H, Rohde LA e Polanczyk G (2011). Do phenotypic characteristics, parental psychopathology, family functioning, and environmental stressors have a role in the response to methylphenidate in children with attention-deficit/hyperactivity disorder? A naturalistic study from a developing country. *J Clin Psychopharmacol* 31: 309-317.
- Cheon KA, Jun JY e Cho DY (2008). Association of the catechol-O-methyltransferase polymorphism with methylphenidate response in a

- classroom setting in children with attention-deficit hyperactivity disorder. *Int Clin Psychopharmacol* 23: 291-298.
- Contini V, Marques FZ, Garcia CE, Hutz MH e Bau CH (2006). MAOA-uVNTR polymorphism in a Brazilian sample: further support for the association with impulsive behaviors and alcohol dependence. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141B: 305-308.
- Contini V, Victor MM, Cerqueira CC, Polina ER, Grevet EH, Salgado CA, Karam RG, Vitola ES, Belmonte-de-Abreu P e Bau CH (2011). Adrenergic alpha2A receptor gene is not associated with methylphenidate response in adults with ADHD. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 261: 205-211.
- Contini V, Victor MM, Marques FZ, Bertuzzi GP, Salgado CA, Silva KL, Sousa NO, Grevet EH, Belmonte-de-Abreu P e Bau CH (2010). Response to methylphenidate is not influenced by DAT1 polymorphisms in a sample of Brazilian adult patients with ADHD. *J Neural Transm* 117: 269-276.
- Curatolo P, D'Agati E e Moavero R (2010). The neurobiological basis of ADHD. *Ital J Pediatr* 36: 79.
- da Silva TL, Pianca TG, Roman T, Hutz MH, Faraone SV, Schmitz M e Rohde LA (2008). Adrenergic alpha2A receptor gene and response to methylphenidate in attention-deficit/hyperactivity disorder-predominantly inattentive type. *J Neural Transm* 115: 341-345.
- de Cerqueira CC, Polina ER, Contini V, Marques FZ, Grevet EH, Salgado CA, da Silva PO, Picon FA, Belmonte-de-Abreu P e Bau CH (2010). ADRA2A polymorphisms and ADHD in adults: possible mediating effect of personality. *Psychiatry Res* 186: 345-350.
- Faraone SV, Biederman J e Mick E (2006). The age-dependent decline of attention deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis of follow-up studies. *Psychol Med* 36: 159-165.
- Faraone SV e Mick E (2010). Molecular genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr Clin North Am* 33: 159-180.
- Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE, Smoller JW, Goralnick JJ, Holmgren MA e Sklar P (2005). Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57: 1313-1323.

- Faraone SV, Spencer T, Aleardi M, Pagano C e Biederman J (2004). Meta-analysis of the efficacy of methylphenidate for treating adult attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychopharmacol* 24: 24-29.
- Fischer AG, Bau CH, Grevet EH, Salgado CA, Victor MM, Kalil KL, Sousa NO, Garcia CR e Belmonte-de-Abreu P (2007). The role of comorbid major depressive disorder in the clinical presentation of adult ADHD. *J Psychiatr Res* 41: 991-996.
- Franke B, Neale BM e Faraone SV (2009). Genome-wide association studies in ADHD. *Hum Genet* 126: 13-50.
- Franke B, Vasquez AA, Johansson S, Hoogman M, Romanos J, Boreatti-Hummer A, Heine M, Jacob CP, Lesch KP, Casas M e cols. (2010). Multicenter analysis of the SLC6A3/DAT1 VNTR haplotype in persistent ADHD suggests differential involvement of the gene in childhood and persistent ADHD. *Neuropsychopharmacology* 35: 656-664.
- Freire MT, Marques FZ, Hutz MH e Bau CH (2006). Polymorphisms in the DBH and DRD2 gene regions and smoking behavior. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 256: 93-97.
- Froehlich TE, McGough JJ e Stein MA (2010). Progress and promise of attention-deficit hyperactivity disorder pharmacogenetics. *CNS Drugs* 24: 99-117.
- Garcia CR, Bau CH, Silva KL, Callegari-Jacques SM, Salgado CA, Fischer AG, Victor MM, Sousa NO, Karam RG, Rohde LA e cols. (2010). The burdened life of adults with ADHD: Impairment beyond comorbidity. *Eur Psychiatry*.
- Gehricke JG, Hong N, Whalen CK, Steinhoff K e Wigal TL (2009). Effects of transdermal nicotine on symptoms, moods, and cardiovascular activity in the everyday lives of smokers and nonsmokers with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychol Addict Behav* 23: 644-655.
- Genro JP, Polanczyk GV, Zeni C, Oliveira AS, Roman T, Rohde LA e Hutz MH (2008). A common haplotype at the dopamine transporter gene 5' region is associated with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B: 1568-1575.
- Gizer IR, Ficks C e Waldman ID (2009). Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet* 126: 51-90.

- Gottesman II e Gould TD (2003). The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *Am J Psychiatry* 160: 636-645.
- Grady DL, Chi HC, Ding YC, Smith M, Wang E, Schuck S, Flodman P, Spence MA, Swanson JM e Moyzis RK (2003). High prevalence of rare dopamine receptor D4 alleles in children diagnosed with attention-deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 8: 536-545.
- Grady DL, Harxhi A, Smith M, Flodman P, Spence MA, Swanson JM e Moyzis RK (2005). Sequence variants of the DRD4 gene in autism: further evidence that rare DRD4 7R haplotypes are ADHD specific. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 136B: 33-35.
- Grevet EH, Bau CH, Salgado CA, Fischer AG, Kalil K, Victor MM, Garcia CR, Sousa NO, Rohde LA e Belmonte-de-Abreu P (2006). Lack of gender effects on subtype outcomes in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: support for the validity of subtypes. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 256: 311-319.
- Grevet EH, Belmonte-de-Abreu P e Shansis F (2003). Proposta de uma abordagem psicoeducacional em grupos para pacientes adultos com transtorno de déficit de atenção/hiperatividade. *R Psiquiatr RS* 25: 446-452.
- Grevet EH e Rohde LA (2005). Diretrizes e algoritmo para o tratamento do transtorno de déficit de atenção/hiperatividade na infância, adolescência e vida adulta. In: Cordioli, AV. *Psicofármacos: consulta rápida*, 3ª ed. Artmed. Porto Alegre, RS.
- Guimaraes AP, Schmitz M, Polanczyk GV, Zeni C, Genro J, Roman T, Rohde LA e Hutz MH (2009b). Further evidence for the association between attention deficit/hyperactivity disorder and the serotonin receptor 1B gene. *J Neural Transm* 116: 1675-1680.
- Guimaraes AP, Zeni C, Polanczyk G, Genro JP, Roman T, Rohde LA e Hutz MH (2009a). MAOA is associated with methylphenidate improvement of oppositional symptoms in boys with attention deficit hyperactivity disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 12: 709-714.

- Hannestad J, Gallezot JD, Planeta-Wilson B, Lin SF, Williams WA, van Dyck CH, Malison RT, Carson RE e Ding YS (2010). Clinically relevant doses of methylphenidate significantly occupy norepinephrine transporters in humans in vivo. *Biol Psychiatry* 68: 854-860.
- Huizink AC, van Lier PA e Crijnen AA (2009). Attention deficit hyperactivity disorder symptoms mediate early-onset smoking. *Eur Addict Res* 15: 1-9.
- Iacono WG, Malone SM e McGue M (2008). Behavioral disinhibition and the development of early-onset addiction: common and specific influences. *Annu Rev Clin Psychol* 4: 325-348.
- Kalil KL, Bau CH, Grevet EH, Sousa NO, Garcia CR, Victor MM, Fischer AG, Salgado CA e Belmonte-de-Abreu P (2008). Smoking is associated with lower performance in WAIS-R Block Design scores in adults with ADHD. *Nicotine Tob Res* 10: 683-688.
- Kaplan G e Newcorn JH (2011). Pharmacotherapy for child and adolescent attention-deficit hyperactivity disorder. *Pediatr Clin North Am* 58: 99-120, xi.
- Kebir O e Joobar R (2011). Neuropsychological endophenotypes in attention-deficit/hyperactivity disorder: a review of genetic association studies. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*.
- Kereszturi E, Tarnok Z, Bogнар E, Lakatos K, Farkas L, Gadoros J, Sasvari-Szekely M e Nemoda Z (2008). Catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism is associated with methylphenidate response in ADHD children. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B: 1431-1435.
- Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Koretz D, Merikangas KR, Rush AJ, Walters EE e Wang PS (2003). The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *Jama* 289: 3095-3105.
- Kessler RC, Chiu WT, Demler O, Merikangas KR e Walters EE (2005). Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry* 62: 617-627.
- Kieling C, Genro JP, Hutz MH e Rohde LA (2010). A current update on ADHD pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 11: 407-419.

- Kieling R e Rohde LA (2011). ADHD in Children and Adults: Diagnosis and Prognosis. *Curr Top Behav Neurosci*.
- Koesters M, Becker T, Kilian R, Fegert JM e Weinmann S (2009). Limits of meta-analysis: methylphenidate in the treatment of adult attention-deficit hyperactivity disorder. *J Psychopharmacol* 23: 733-744.
- Konrad K e Eickhoff SB (2010). Is the ADHD brain wired differently? A review on structural and functional connectivity in attention deficit hyperactivity disorder. *Hum Brain Mapp* 31: 904-916.
- Kooij JS, Boonstra AM, Vermeulen SH, Heister AG, Burger H, Buitelaar JK e Franke B (2008). Response to methylphenidate in adults with ADHD is associated with a polymorphism in SLC6A3 (DAT1). *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B: 201-208.
- Kooij SJ, Bejerot S, Blackwell A, Caci H, Casas-Brugue M, Carpentier PJ, Edvinsson D, Fayyad J, Foeken K, Fitzgerald M e cols. (2010). European consensus statement on diagnosis and treatment of adult ADHD: The European Network Adult ADHD. *BMC Psychiatry* 10: 67.
- Krause J, la Fougere C, Krause KH, Ackenheil M e Dresel SH (2005). Influence of striatal dopamine transporter availability on the response to methylphenidate in adult patients with ADHD. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 255: 428-431.
- la Fougere C, Krause J, Krause KH, Josef Gildehaus F, Hacker M, Koch W, Hahn K, Tatsch K e Dresel S (2006). Value of 99mTc-TRODAT-1 SPECT to predict clinical response to methylphenidate treatment in adults with attention deficit hyperactivity disorder. *Nucl Med Commun* 27: 733-737.
- Langley K, Fowler T, Ford T, Thapar AK, van den Bree M, Harold G, Owen MJ, O'Donovan MC e Thapar A (2010). Adolescent clinical outcomes for young people with attention-deficit hyperactivity disorder. *Br J Psychiatry* 196: 235-240.
- Lara C, Fayyad J, de Graaf R, Kessler RC, Aguilar-Gaxiola S, Angermeyer M, Demyttenaere K, de Girolamo G, Haro JM, Jin R e cols. (2009). Childhood predictors of adult attention-deficit/hyperactivity disorder: results from the World Health Organization World Mental Health Survey Initiative. *Biol Psychiatry* 65: 46-54.

- Lee SS, Humphreys KL, Flory K, Liu R e Glass K (2011). Prospective association of childhood attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and substance use and abuse/dependence: a meta-analytic review. *Clin Psychol Rev* 31: 328-341.
- Levin ED, Conners CK, Silva D, Hinton SC, Meck WH, March J e Rose JE (1998). Transdermal nicotine effects on attention. *Psychopharmacology (Berl)* 140: 135-141.
- Levin ED e Rezvani AH (2000). Development of nicotinic drug therapy for cognitive disorders. *Eur J Pharmacol* 393: 141-146.
- Liston C, Cohen MM, Teslovich T, Levenson D e Casey BJ (2011). Atypical prefrontal connectivity in attention-deficit/hyperactivity disorder: pathway to disease or pathological end point? *Biol Psychiatry* 69: 1168-1177.
- Louzã-Neto MR (2010). TDAH (transtorno de déficit de atenção/hiperatividade) ao longo da vida. Artmed. Porto Alegre, RS.
- Makris N, Biederman J, Monuteaux MC e Seidman LJ (2009). Towards conceptualizing a neural systems-based anatomy of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Dev Neurosci* 31: 36-49.
- Manor I, Laiba E, Eisenberg J, Meidad S, Lerer E, Israel S, Gritsenko I, Tyano S, Faraone SV e Ebstein RP (2008). Association between tryptophan hydroxylase 2, performance on a continuance performance test and response to methylphenidate in ADHD participants. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B: 1501-1508.
- Marques FZ, Hutz MH e Bau CH (2006). Influence of the serotonin transporter gene on comorbid disorders among alcohol-dependent individuals. *Psychiatr Genet* 16: 125-131.
- Masellis M, Basile VS, Muglia P, Ozdemir V, Macciardi FM e Kennedy JL (2002). Psychiatric pharmacogenetics: personalizing psychostimulant therapy in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Behav Brain Res* 130: 85-90.
- McGough J, McCracken J, Swanson J, Riddle M, Kollins S, Greenhill L, Abikoff H, Davies M, Chuang S, Wigal T e cols. (2006). Pharmacogenetics of methylphenidate response in preschoolers with ADHD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 45: 1314-1322.



- Mick E, Biederman J, Spencer T, Faraone SV e Sklar P (2006). Absence of association with DAT1 polymorphism and response to methylphenidate in a sample of adults with ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141B: 890-894.
- Mick E, Neale B, Middleton FA, McGough JJ e Faraone SV (2008). Genome-wide association study of response to methylphenidate in 187 children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B: 1412-1418.
- Mick E, Todorov A, Smalley S, Hu X, Loo S, Todd RD, Biederman J, Byrne D, Dechairo B, Guiney A e cols. (2010). Family-based genome-wide association scan of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 49: 898-905 e893.
- Neale BM, Medland S, Ripke S, Anney RJ, Asherson P, Buitelaar J, Franke B, Gill M, Kent L, Holmans P e cols. (2010). Case-control genome-wide association study of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 49: 906-920.
- Newcorn JH (2008). Co-morbidity in adults with ADHD. *CNS Spectr* 13: 12-15.
- Nordquist N e Oreland L (2010). Serotonin, genetic variability, behaviour, and psychiatric disorders--a review. *Ups J Med Sci* 115: 2-10.
- Owens MJ e Nemeroff CB (1994). Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter. *Clin Chem* 40: 288-295.
- Poelmans G, Pauls DL, Buitelaar JK e Franke B (2011). Integrated genome-wide association study findings: identification of a neurodevelopmental network for attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* 168: 365-377.
- Polanczyk G, Bigarella MP, Hutz MH e Rohde LA (2010). Pharmacogenetic approach for a better drug treatment in children. *Curr Pharm Des* 16: 2462-2473.
- Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, Biederman J e Rohde LA (2007a). The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry* 164: 942-948.
- Polanczyk G, Faraone SV, Bau CH, Victor MM, Becker K, Pelz R, Buitelaar JK, Franke B, Kooij S, van der Meulen E e cols. (2008). The impact of individual

- and methodological factors in the variability of response to methylphenidate in ADHD pharmacogenetic studies from four different continents. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B: 1419-1424.
- Polanczyk G e Jensen P (2008). Epidemiologic considerations in attention deficit hyperactivity disorder: a review and update. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 17: 245-260, vii.
- Polanczyk G, Zeni C, Genro JP, Guimaraes AP, Roman T, Hutz MH e Rohde LA (2007b). Association of the adrenergic alpha2A receptor gene with methylphenidate improvement of inattentive symptoms in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry* 64: 218-224.
- Polina ER, Contini V, Hutz MH e Bau CH (2009). The serotonin 2A receptor gene in alcohol dependence and tobacco smoking. *Drug Alcohol Depend* 101: 128-131.
- Poltavski DV e Petros T (2006). Effects of transdermal nicotine on attention in adult non-smokers with and without attentional deficits. *Physiol Behav* 87: 614-624.
- Potter AS, Newhouse PA e Bucci DJ (2006). Central nicotinic cholinergic systems: a role in the cognitive dysfunction in attention-deficit/hyperactivity disorder? *Behav Brain Res* 175: 201-211.
- Prestes AP, Marques FZ, Hutz MH, Roman T e Bau CH (2007). Tobacco smoking and the ADRA2A C-1291G polymorphism. *J Neural Transm* 114: 1503-1506.
- Prince J (2008). Catecholamine dysfunction in attention-deficit/hyperactivity disorder: an update. *J Clin Psychopharmacol* 28: S39-45.
- Purper-Ouakil D, Ramoz N, Lepagnol-Bestel AM, Gorwood P e Simonneau M (2011). Neurobiology of attention deficit/hyperactivity disorder. *Pediatr Res* 69: 69R-76R.
- Quist JF e Kennedy JL (2001). Genetics of childhood disorders: XXIII. ADHD, Part 7: The serotonin system. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 40: 253-256.
- Rohde LA (2002). ADHD in Brazil: the DSM-IV criteria in a culturally different population. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 41: 1131-1133.

- Rohde LA, Biederman J, Busnello EA, Zimmermann H, Schmitz M, Martins S e Tramontina S (1999). ADHD in a school sample of Brazilian adolescents: a study of prevalence, comorbid conditions, and impairments. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 38: 716-722.
- Rohde LA, Biederman J, Zimmermann H, Schmitz M, Martins S e Tramontina S (2000). Exploring ADHD age-of-onset criterion in Brazilian adolescents. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 9: 212-218.
- Rohde LA e Halpern R (2004). [Recent advances on attention deficit/hyperactivity disorder]. *J Pediatr (Rio J)* 80: S61-70.
- Roman T, Polanczyk GV, Zeni C, Genro JP, Rohde LA e Hutz MH (2006). Further evidence of the involvement of alpha-2A-adrenergic receptor gene (ADRA2A) in inattentive dimensional scores of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 11: 8-10.
- Roman T, Schmitz M, Polanczyk GV, Eizirik M, Rohde LA e Hutz MH (2003). Is the alpha-2A adrenergic receptor gene (ADRA2A) associated with attention-deficit/hyperactivity disorder? *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 120B: 116-120.
- Rommelse NN, Altink ME, Oosterlaan J, Buschgens CJ, Buitelaar J e Sergeant JA (2008). Support for an independent familial segregation of executive and intelligence endophenotypes in ADHD families. *Psychol Med* 38: 1595-1606.
- Rubia K, Cubillo A, Smith AB, Woolley J, Heyman I e Brammer MJ (2010). Disorder-specific dysfunction in right inferior prefrontal cortex during two inhibition tasks in boys with attention-deficit hyperactivity disorder compared to boys with obsessive-compulsive disorder. *Hum Brain Mapp* 31: 287-299.
- Salatino-Oliveira A, Genro JP, Zeni C, Polanczyk GV, Chazan R, Guimaraes AP, Callegari-Jacques SM, Rohde LA e Hutz MH (2011). Catechol-O-Methyltransferase Valine158Methionine Polymorphism Moderates Methylphenidate Effects on Oppositional Symptoms in Boys with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Biol Psychiatry* 70: 216-221.
- Salgado CA, Bau CH, Grevet EH, Fischer AG, Victor MM, Kalil KL, Sousa NO, Garcia CR e Belmonte-de-Abreu P (2009). Inattention and hyperactivity

- dimensions of ADHD are associated with different personality profiles. *Psychopathology* 42: 108-112.
- Schmitz M, Denardin D, Silva TL, Pianca T, Roman T, Hutz MH, Faraone SV e Rohde LA (2006). Association between alpha-2a-adrenergic receptor gene and ADHD inattentive type. *Biol Psychiatry* 60: 1028-1033.
- Schork NJ, Murray SS, Frazer KA e Topol EJ (2009). Common vs. rare allele hypotheses for complex diseases. *Curr Opin Genet Dev* 19: 212-219.
- Schultz MR, Rabi K, Faraone SV, Kremen W e Lyons MJ (2006). Efficacy of retrospective recall of attention-deficit hyperactivity disorder symptoms: A twin study. *Twin Res Hum Genet* 9: 220-232.
- Seeger G, Schloss P e Schmidt MH (2001). Marker gene polymorphisms in hyperkinetic disorder--predictors of clinical response to treatment with methylphenidate? *Neurosci Lett* 313: 45-48.
- Shaw P, Eckstrand K, Sharp W, Blumenthal J, Lerch JP, Greenstein D, Clasen L, Evans A, Giedd J e Rapoport JL (2007). Attention-deficit/hyperactivity disorder is characterized by a delay in cortical maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 19649-19654.
- Shaw P, Gilliam M, Liverpool M, Weddle C, Malek M, Sharp W, Greenstein D, Evans A, Rapoport J e Giedd J (2011). Cortical development in typically developing children with symptoms of hyperactivity and impulsivity: support for a dimensional view of attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* 168: 143-151.
- Simon V, Czobor P, Balint S, Meszaros A e Bitter I (2009). Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis. *Br J Psychiatry* 194: 204-211.
- Solanto MV (2002). Dopamine dysfunction in AD/HD: integrating clinical and basic neuroscience research. *Behav Brain Res* 130: 65-71.
- Sonuga-Barke EJ (2005). Causal models of attention-deficit/hyperactivity disorder: from common simple deficits to multiple developmental pathways. *Biol Psychiatry* 57: 1231-1238.

- Sonuga-Barke EJ, Sergeant JA, Nigg J e Willcutt E (2008). Executive dysfunction and delay aversion in attention deficit hyperactivity disorder: nosologic and diagnostic implications. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 17: 367-384, ix.
- Sousa NO, Grevet EH, Salgado CA, Silva KL, Victor MM, Karam RG, Vitola ES, Picon FA, Zeni GD, Rohde LA e cols. (2011). Smoking and ADHD: an evaluation of self medication and behavioral disinhibition models based on comorbidity and personality patterns. *J Psychiatr Res* 45: 829-834.
- Stergiakouli E e Thapar A (2010). Fitting the pieces together: current research on the genetic basis of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Neuropsychiatr Dis Treat* 6: 551-560.
- Szobot CM e Bukstein O (2008). Attention deficit hyperactivity disorder and substance use disorders. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 17: 309-323, viii.
- Szobot CM e Romano M (2007). Co-ocorrência entre transtorno de déficit de atenção/hiperatividade e uso de substâncias psicoativas. *J Bras Psiquiatr* 56: 39-44.
- Tandon M e Pruett JR, Jr. (2008). An overview of the use of antidepressants in children and adolescents. *Mo Med* 105: 79-84; quiz 84-75.
- Thapar A, Rice F, Hay D, Boivin J, Langley K, van den Bree M, Rutter M e Harold G (2009). Prenatal smoking might not cause attention-deficit/hyperactivity disorder: evidence from a novel design. *Biol Psychiatry* 66: 722-727.
- Tovo-Rodrigues L, Rohde LA, Roman T, Schmitz M, Polanczyk G, Zeni C, Marques FZ, Contini V, Grevet EH, Belmonte-de-Abreu P e cols. (2011). Is there a role for rare variants in DRD4 gene in the susceptibility for ADHD? Searching for an effect of allelic heterogeneity. *Mol Psychiatry*.
- Tripp G e Wickens JR (2009). Neurobiology of ADHD. *Neuropharmacology* 57: 579-589.
- van den Berg SM, Willemsen G, de Geus EJ e Boomsma DI (2006). Genetic etiology of stability of attention problems in young adulthood. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141B: 55-60.
- Victor MM, Grevet EH, Salgado CA, Silva KL, Sousa NO, Karam RG, Vitola ES, Picon FA, Zeni GD, Contini V e cols. (2009). Reasons for pretreatment attrition

- and dropout from methylphenidate in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: the role of comorbidities. *J Clin Psychopharmacol* 29: 614-616.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS e Ding YS (2005). Imaging the effects of methylphenidate on brain dopamine: new model on its therapeutic actions for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57: 1410-1415.
- Wallis D (2010). The search for biomarkers for attention deficit/hyperactivity disorder. *Drug News Perspect* 23: 438-449.
- Weinshilboum R (2003). Inheritance and drug response. *N Engl J Med* 348: 529-537.
- Wigal SB (2009). Efficacy and safety limitations of attention-deficit hyperactivity disorder pharmacotherapy in children and adults. *CNS Drugs* 23 Suppl 1: 21-31.
- Wilens TE (2008). Effects of methylphenidate on the catecholaminergic system in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychopharmacol* 28: S46-53.
- Wilens TE, Adamson J, Sgambati S, Whitley J, Santry A, Monuteaux MC e Biederman J (2007). Do individuals with ADHD self-medicate with cigarettes and substances of abuse? Results from a controlled family study of ADHD. *Am J Addict* 16 Suppl 1: 14-21; quiz 22-13.
- Wilens TE e Morrison NR (2011). The intersection of attention-deficit/hyperactivity disorder and substance abuse. *Curr Opin Psychiatry* 24: 280-285.
- Wilens TE e Spencer TJ (2010). Understanding attention-deficit/hyperactivity disorder from childhood to adulthood. *Postgrad Med* 122: 97-109.
- Winsberg BG e Comings DE (1999). Association of the dopamine transporter gene (DAT1) with poor methylphenidate response. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 38: 1474-1477.
- Young SE, Friedman NP, Miyake A, Willcutt EG, Corley RP, Haberstick BC e Hewitt JK (2009). Behavioral disinhibition: liability for externalizing spectrum disorders and its genetic and environmental relation to response inhibition across adolescence. *J Abnorm Psychol* 118: 117-130.
- Zeni CP, Guimaraes AP, Polanczyk GV, Genro JP, Roman T, Hutz MH e Rohde LA (2007). No significant association between response to methylphenidate and genes of the dopaminergic and serotonergic systems in a sample of

Brazilian children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B: 391-394.

Zhou K, Dempfle A, Arcos-Burgos M, Bakker SC, Banaschewski T, Biederman J, Buitelaar J, Castellanos FX, Doyle A, Ebstein RP e cols. (2008). Meta-analysis of genome-wide linkage scans of attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B: 1392-1398.

## ANEXOS

### Anexo 1 Termo de Consentimento Informado

#### TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

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

Prezado(a) Senhor(a):

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

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

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

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

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

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

\_\_\_\_\_  
Paciente

\_\_\_\_\_  
Responsável

\_\_\_\_\_  
Pesquisador



## Anexo 2 Aprovação – Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde - HCPA



### HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

#### RESOLUÇÃO

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

**Projeto:** 01-321

**Versão do Projeto:** 22/01/2002

**Versão do TCLE:** 22/01/2002

**Pesquisadores:**

PAULO SILVA BELMONTE DE ABREU

CLAITON H. O. BAU

EUGENIO GREVET

CARLOS ALBERTO IGLESIAS SALGADO

BETINA CHAIT

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

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA.

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

Porto Alegre, 25 de janeiro de 2002.

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