

Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

TESIS DOCTORAL

Desarrollo de un sistema de genotipado para la aplicación en el “trastorno por déficit de atención con hiperactividad” y su Farmacogenética

ARAITZ MOLANO BILBAO

2012



Esta obra está bajo una [Licencia Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Unported](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

El presente trabajo ha sido realizado en la empresa Progenika Biopharma S.A. en colaboración con el Departamento de Farmacología de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea gracias a la ayuda de una beca predoctoral concedida por el Departamento de Industria, Innovación, Comercio y Turismo del Gobierno Vasco (Programa IKERTU) durante el periodo 2007-2012. Todo ello en el marco de un proyecto financiado por JUSTE SAFQ. La autora agradece a la Universidad, al Gobierno Vasco y a ambas compañías la oportunidad ofrecida.

La autora agradece especialmente el apoyo obtenido de los colaboradores clínicos para el reclutamiento de las muestras de pacientes diagnosticados con trastorno por déficit de atención con hiperactividad, necesarias para el estudio.



“Si nuestro cerebro fuera tan sencillo como para poder entenderlo, seríamos tan tontos que, de todos modos, no lo podríamos entender”

Jostein Gaarder (1952-), escritor

En primer lugar debo agradecer la confianza que los Doctores Antonio Martínez, Consejero Delegado de Progenika Biopharma y Diego Tejedor, Director Técnico de Progenika Biopharma han depositado en mí al acogerme y ofrecerme la oportunidad de participar en este gran proyecto y por toda la formación recibida durante este tiempo.

Quisiera agradecer sinceramente el gran esfuerzo realizado por mis directores de Tesis el Dr. Marcel Ferrer Alcón y el Dr. J.Javier Meana Martínez para llevar a buen puerto este proyecto. Es mi obligación mostrar también mi gratitud a Estibaliz que me ha apoyado durante todos estos años dándome consejos e ideas muy valiosos. También a Marta que tanto me ha guiado en la etapa final, sobre todo con la parte estadística.

A mis compañeras de Progenika, Karina, Magda, Maite, Edurne e Iratxe por darme tan buenos momentos dentro y fuera del trabajo, y hacerme superar los pequeños baches que ha habido a base de risas, bizcochos y mucho cotilleo. Magda tú eres la próxima, ánimo que todo llega. También me gustaría hacer una mención especial a los plataformeros Xabi, Rachid y Manu y al resto de compañeros que seguro que han tenido que oír alguna queja durante estos casi 5 años, a los de la pradera, y especialmente a Jokin y Nerea que me han ayudado con la crisis final de los ORs, ya llevaré algún dulce para celebrarlo.

A mis amigas de toda la vida, Esti, Miriam, Rebe, Maru, Iran, Sonia, Ainhoa, Ana, Mariana y en especial a Mireia que sabe lo que se sufre con la tesis y es una Doctora reciente. Aunque mi vida social se ha reducido notablemente estos últimos años, ellas siempre han estado dispuestas a llevarme de fiesta y a lo que haga falta. Gracias también a los chicos (Ander, Txapi, Aritz y compañía).

A mis padres, Pablo y Elicia, que aunque no conozcan muy bien los entresijos del genotipado siempre me han mostrado su apoyo incondicional y siempre lo harán. “Sí, aita/ama ¡por fin he acabado la tesis!”. A Ilun y Pantxito que no es que me hayan ayudado mucho pero también son de la familia.

Y por último y más importante, a Andoni, mi compañero y amigo, por quitarle hierro a los problemas y hacerme reír cuando más lo necesitaba. Ya no me oirás más decir “tengo que escribir tesis...”.

Seguro que me he dejado a alguien por mencionar, lo siento, pero no me lo tengas en cuenta porque después de escribir casi 400 páginas ya no me quedaba tinta para escribir todos los agradecimientos que debería...

Gracias a tod@s!

Araitz

El trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) es el trastorno neuropsiquiátrico más común en la infancia, con una prevalencia del 8 al 12% entre la población infanto-juvenil en todo el mundo, de los cuales el 50% mantiene los síntomas en la edad adulta. Estos síntomas afectan gravemente a la vida social, académica y laboral del individuo. A pesar de que la eficacia de los tratamientos farmacológicos actuales está ampliamente demostrada en ensayos clínicos (Wilens et al. 2005), un número significativo de pacientes abandona el tratamiento y existe una enorme variabilidad en la tolerancia y aceptación del mismo, debido en parte a factores genéticos (Stein y McGough 2008). Esta variabilidad también podría deberse a la existencia de diferentes subgrupos dentro de la enfermedad, ya que los pacientes con TDAH forman un grupo muy heterogéneo en cuanto a la presencia e intensidad de las manifestaciones clínicas, siendo además frecuente la presencia de comorbilidades.

Este trabajo se planteó con la finalidad de estudiar la asociación entre polimorfismos genéticos tanto con la variabilidad en la respuesta al tratamiento farmacológico del TDAH como con la heterogeneidad clínica presente en el trastorno. Todo ello con la intención de desarrollar una herramienta de genotipado con un alto grado de sensibilidad y especificidad para mejorar la terapéutica del TDAH. Se elaboró un estudio descriptivo, observacional, de corte transversal centrado en población principalmente infanto-juvenil de origen español.

Con el desarrollo de los dos estudios (piloto y completo) se observó que el empleo de chips de genotipado es de gran utilidad para realizar estudios de asociación de enfermedades psiquiátricas, constituyendo además una potencial herramienta de aplicación clínica, flexible a la inclusión de nuevos polimorfismos de interés. Sin embargo, cuando se necesitó analizar un número alto de muestras y polimorfismos fue necesario recurrir a las técnicas de alta capacidad de genotipado. Se encontraron numerosos polimorfismos asociados significativamente tanto con el diagnóstico de TDAH como con los distintos fenotipos asociados analizados (buena o mala evolución, presencia o ausencia de comorbilidades...), apoyando la teoría de que el TDAH agrupa a distintos procesos con mecanismos patogénicos próximos pero diferentes. Conocer estas diferencias podría ayudar a aplicar un tratamiento personalizado a cada paciente. Por el contrario, no se encontraron asociaciones directas entre los polimorfismos analizados y la respuesta terapéutica a atomoxetina o metilfenidato.

| | |
|--|-----------|
| I. INTRODUCCIÓN | 23 |
| 1. EL TRASTORNO DE DÉFICIT DE ATENCIÓN CON HIPERACTIVIDAD | 25 |
| 1.1. DESCRIPCIÓN CLÍNICA | 26 |
| 1.1.1. SINTOMATOLOGÍA..... | 26 |
| 1.1.2. DIAGNÓSTICO | 29 |
| 1.1.3. SUBTIPOS DE TDAH | 33 |
| 1.1.4. COMORBILIDAD PSIQUIÁTRICA | 34 |
| 1.2. EPIDEMIOLOGÍA | 37 |
| 1.3. HIPÓTESIS NEUROBIOLÓGICAS DEL TDAH..... | 38 |
| 1.3.1. HIPÓTESIS DOPAMINÉRGICA..... | 39 |
| 1.3.2. HIPÓTESIS NORADRENÉRGICA | 41 |
| 1.3.3. HIPÓTESIS SEROTONINÉRGICA | 42 |
| 1.3.4. HIPÓTESIS ALTERNATIVAS | 43 |
| 1.4. GENÉTICA DEL TDAH | 43 |
| 1.4.1. ESTUDIOS FAMILIARES | 44 |
| 1.4.2. ESTUDIOS DE GENÉTICA MOLECULAR | 46 |
| 1.4.2.1. GENES CATECOLAMINÉRGICOS | 53 |
| 1.4.2.1.1. SÍNTESIS CATECOLAMINAS | 54 |
| 1.4.2.1.2. SISTEMA DOPAMINÉRGICO | 55 |
| 1.4.2.1.3. SISTEMA NORADRENÉRGICO..... | 58 |
| 1.4.2.1.4. METABOLISMO DE CATECOLAMINAS | 60 |
| 1.4.2.2. EL SISTEMA SEROTONÉRGICO | 62 |
| 1.4.2.3. OTROS GENES CANDIDATOS | 64 |
| 1.4.3. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN | 66 |
| 1.4.3.1. ENDOFENOTIPOS..... | 67 |
| 1.5. TRATAMIENTO | 68 |
| 1.5.1. TRATAMIENTO ESTIMULANTE: METILFENIDATO (MTF)..... | 70 |
| 1.5.2. TRATAMIENTO NO ESTIMULANTE: ATOMOXETINA (ATX)..... | 72 |
| 2. FARMACOGENÉTICA | 74 |
| 2.1. FARMACOGENÉTICA DEL TDAH | 77 |
| 2.1.1. GENES ASOCIADOS CON RESPUESTA A METILFENIDATO | 79 |
| 2.1.1.1. TRANSPORTADOR DE DOPAMINA (DAT1) | 79 |
| 2.1.1.2. RECEPTOR DE DOPAMINA D4 (DRD4)..... | 79 |
| 2.1.1.3. CARBOXILESTERASA 1 (CES1) | 80 |
| 2.1.1.4. CATECOL-O-METILTRANSFERASA (COMT) | 80 |
| 2.1.1.5. TRANSPORTADOR DE SEROTONINA (SLC6A4) | 81 |
| 2.1.1.6. ADRENOCEPTOR α 2A Y TRANSPORTADOR DE NORADRENALINA (ADRA2A y NET1)..... | 82 |
| 2.1.1.7. PROTEÍNA ASOCIADA AL SINAPTOSOMA 25KDa (SNAP25) | 82 |
| 2.1.1.8. LATROFILINA 3 (LPHN3)..... | 83 |

| | |
|---|------------|
| 2.1.2. GENES ASOCIADOS CON RESPUESTA A ATOMOXETINA..... | 83 |
| 2.1.2.1. Citocromo P450 (CYP450)..... | 83 |
| 2.1.2.1.1. ISOFORMA 2D6 (CYP2D6) | 83 |
| 2.1.2.2. TRANSPORTADOR DE DOPAMINA (DAT1) | 85 |
| 2.1.2.3. RECEPTOR DE DOPAMINA (DRD4) | 85 |
| 2.1.2.4. TRANSPORTADOR DE NORADRENALINA (NET1) | 86 |
| 3. HERRAMIENTAS DE GENOTIPADO..... | 87 |
| 3.1. POLIMORFISMOS DE CAMBIO DE NUCLEÓTIDO (SNPs) | 87 |
| 3.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)..... | 87 |
| 3.3. CHIPS DE ADN | 89 |
| 3.4. TÉCNICAS DE ALTA CAPACIDAD DE GENOTIPADO | 90 |
| 3.4.1. ENSAYO GOLDENGATE®..... | 90 |
| 3.4.2. GENOTIPADO MEDIANTE PCR COMPETITIVA (ENSAYO KASPar®) | 93 |
| II. OBJETIVOS | 95 |
| III. SUJETOS MATERIALES Y MÉTODOS | 99 |
| 1. SUJETOS PARTICIPANTES..... | 101 |
| 1.1. CENTROS COLABORADORES..... | 101 |
| 1.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN | 102 |
| 1.2.1. PACIENTES TDAH..... | 102 |
| 1.2.2. CONTROLES SANOS | 102 |
| 1.3. MUESTRAS..... | 102 |
| 1.3.1. TAMAÑO MUESTRAL | 102 |
| 1.3.2. CONSIDERACIONES ÉTICAS | 103 |
| 1.3.3. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE PACIENTES DE TDAH..... | 104 |
| 1.3.4. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE CONTROLES SANOS..... | 107 |
| 1.3.5. EXTRACCIÓN DEL ADN | 107 |
| 1.3.6. ELABORACIÓN BASE DE DATOS CLÍNICOS | 108 |
| 2. MATERIALES UTILIZADOS..... | 109 |
| 3. TIPO DE ESTUDIO..... | 113 |
| 4. ESTUDIO PILOTO..... | 117 |
| <u>FASE 1: DISEÑO Y DESARROLLO DEL CHIP DE GENOTIPADO.....</u> | <u>117</u> |
| 4.1. BÚSQUEDA EN LA LITERATURA DE LOS SNPs..... | 117 |

| | |
|---|------------|
| 4.2. DISEÑO DE CEBADORES ESPECÍFICOS | 119 |
| 4.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS PCRs INDIVIDUALES..... | 120 |
| 4.4. CONFIRMACIÓN POR SECUENCIACIÓN | 121 |
| 4.5. OPTIMIZACIÓN DE LAS PCRs MULTIPLEX | 122 |
| 4.6. DISEÑO DE LAS SECUENCIAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS | 123 |
| 4.7. PRODUCCIÓN DEL CHIP DE GENOTIPADO | 124 |
| 4.8. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LA HIBRIDACIÓN | 125 |
| 4.8.1. FRAGMENTACIÓN DE LA MUESTRA | 126 |
| 4.8.2. MARCAJE DE LA MUESTRA | 126 |
| 4.9. HIBRIDACIÓN DE LA MUESTRA EN EL CHIP DE GENOTIPADO | 127 |
| 4.10. ESCANEADO Y CUANTIFICACIÓN DE LA HIBRIDACIÓN..... | 130 |
| 4.10.1. ESCANEADO DEL CHIP DE GENOTIPADO | 130 |
| 4.10.2. CUANTIFICACIÓN DE LA HIBRIDACIÓN | 133 |
| 4.11. OPTIMIZACIÓN DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS DE DETECCIÓN | 134 |
| 4.12. VALIDACIÓN TÉCNICA CHIP DE GENOTIPADO | 135 |
| <u>FASE 2: ANÁLISIS PRELIMINAR DE ASOCIACIÓN CON MUESTRAS DE PACIENTES DE</u> <u>TDAH.....</u> | <u>136</u> |
| 5. ESTUDIO COMPLETO DE ASOCIACIÓN | 138 |
| 5.1. ACTUALIZACIÓN EN LA LITERATURA DE SNPs E INCLUSIÓN DE REORDENAMIENTOS GENÓMICOS Y VNTRs | 138 |
| 5.1.1. ACTUALIZACIÓN DE SNPs | 139 |
| 5.1.2. INCLUSIÓN DE REORDENAMIENTOS GENÓMICOS Y VNTRs | 142 |
| 5.1.3. CITOCROMO P450 ISOFORMA 2D6 (CYP2D6) | 142 |
| 5.2. AMPLIFICACIÓN DEL ADN GENÓMICO | 143 |
| 5.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA SU GENOTIPADO | 144 |
| 5.4. ENSAYO DE GENOTIPADO GOLDENGATE®..... | 144 |
| 5.4.1. ANÁLISIS VIABILIDAD DE SNPs | 144 |
| 5.4.2. PROTOCOLO DEL ENSAYO GOLDENGATE®..... | 147 |
| 5.4.3. OBTENCIÓN DE LOS RESULTADOS DE GENOTIPADO MEDIANTE ENSAYO GOLDENGATE®..... | 148 |
| 5.5. GENOTIPADO MEDIANTE PCR COMPETITIVA (ENSAYO KASPar®) | 149 |
| 5.5.1. SÍNTESIS Y VALIDACIÓN DE LAS SONDAS ESPECÍFICAS | 150 |
| 5.5.2. PROTOCOLO DEL ENSAYO KASPar®..... | 150 |
| 5.5.3. OBTENCIÓN DE LOS RESULTADOS DE GENOTIPADO MEDIANTE ENSAYO KASPar®..... | 151 |
| 5.6. GENOTIPADO DEL CYP2D6: PHARMAchip®..... | 151 |
| 5.6.1. PROTOCOLO DE GENOTIPADO PHARMAchip® | 152 |
| 5.6.2. OBTENCIÓN DE LOS RESULTADOS DE GENOTIPADO MEDIANTE PHARMAchip®..... | 155 |

| | |
|--|------------|
| 5.7. KIT DE DETECCIÓN DE REORDENAMIENTOS GENÓMICOS Y VNTRs..... | 156 |
| 5.7.1. DISEÑO DE CEBADORES ESPECÍFICOS | 157 |
| 5.7.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS PCRs | 157 |
| 5.7.3. CONFIRMACIÓN POR SECUENCIACIÓN..... | 160 |
| 5.7.4. OBTENCIÓN DE LOS RESULTADOS DE GENOTIPADO MEDIANTE KIT DE DETECCIÓN DE REORDENAMIENTOS GENÓMICOS Y VNTRs | 160 |
| 6. ESTADÍSTICA..... | 161 |
| 6.1. FILTRADO DE MUESTRAS Y POLIMORFISMOS PREVIO AL ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 161 |
| 6.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 164 |
| 6.2.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO VARIABLES CLÍNICAS | 166 |
| 6.2.2. ANÁLISIS UNIVARIANTE DE ASOCIACIÓN..... | 166 |
| 6.2.2.1. ANÁLISIS UNIVARIANTE DE ASOCIACIÓN: SNPs | 167 |
| 6.2.2.2. ANÁLISIS UNIVARIANTE DE ASOCIACIÓN: VARIABLES CLÍNICAS | 168 |
| 6.2.3. ANÁLISIS MULTIVARIANTE | 168 |
| 6.2.3.1. DESARROLLO Y SELECCIÓN DEL MODELO..... | 170 |
| 6.2.3.2. INTERPRETACIÓN DEL MODELO | 171 |
| IV. RESULTADOS..... | 175 |
| 1. ESTUDIO PILOTO..... | 177 |
| <u>FASE 1: DISEÑO Y DESARROLLO DEL CHIP DE GENOTIPADO.....</u> | <u>177</u> |
| 1.1. DISEÑO DE CEBADORES ESPECÍFICOS Y OPTIMIZACIÓN DE LAS PCRs INDIVIDUALES | 177 |
| 1.2. CONFIRMACIÓN POR SECUENCIACIÓN | 179 |
| 1.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS PCRs MULTIPLEX | 179 |
| 1.4. DISEÑO DE LAS SECUENCIAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS | 183 |
| 1.5. PRODUCCIÓN DEL CHIP DE GENOTIPADO | 184 |
| 1.6. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LA HIBRIDACIÓN..... | 184 |
| 1.6.1. AMPLIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS (PCR multiplex) | 184 |
| 1.6.2. FRAGMENTACIÓN DE LA MUESTRA | 185 |
| 1.6.3. MARCAJE DE LA MUESTRA | 186 |
| 1.7. HIBRIDACIÓN DE LA MUESTRA EN EL CHIP DE GENOTIPADO | 186 |
| 1.8. ESCANEADO Y CUANTIFICACIÓN DE LA HIBRIDACIÓN | 186 |
| 1.9. OPTIMIZACIÓN DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS DE DETECCIÓN..... | 188 |
| 1.10. VALIDACIÓN TÉCNICA DEL CHIP DE GENOTIPADO | 189 |
| <u>FASE 2: ANÁLISIS PRELIMINAR DE ASOCIACIÓN CON MUESTRAS DE PACIENTES DE TDAH.....</u> | <u>190</u> |
| 2. ESTUDIO COMPLETO DE ASOCIACIÓN | 194 |
| 2.1. AMPLIFICACIÓN DEL ADN GENÓMICO..... | 194 |

| | |
|--|-----|
| 2.2. ENSAYO DE GENOTIPADO GOLDENGATE [®] | 194 |
| 2.3. GENOTIPADO MEDIANTE PCR COMPETITIVA (ENSAYO KASPAR [®]) | 194 |
| 2.4. GENOTIPADO DEL CYP2D6: PHARMAchip [®] | 195 |
| 2.4.1. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE GENOTIPADO | 195 |
| 2.5. KIT DE DETECCIÓN DE REORDENAMIENTOS GENÓMICOS Y VNTRs | 198 |
| 2.5.1. DISEÑO DE CEBADORES ESPECÍFICOS | 198 |
| 2.5.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS PCRs | 198 |
| 2.5.3. CONFIRMACIÓN POR SECUENCIACIÓN | 199 |
| 2.5.4. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE GENOTIPADO | 200 |
| 2.6. ELABORACIÓN BASE DE DATOS CLÍNICOS | 204 |
| 2.7. FILTRADO DE MUESTRAS Y POLIMORFISMOS PREVIO AL ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 205 |
| 2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 208 |
| 2.8.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO VARIABLES CLÍNICAS | 208 |
| 2.8.1.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO VARIABLES CLÍNICAS: VARIABLES PREDICTORAS | 208 |
| 2.8.1.2. ANÁLISIS DESCRIPTIVO VARIABLES CLÍNICAS: VARIABLES CLASE | 210 |
| 2.8.2. ANÁLISIS UNIVARIANTE DE ASOCIACIÓN | 213 |
| 2.8.2.1. ANÁLISIS UNIVARIANTE DE ASOCIACIÓN: POLIMORFISMOS | 213 |
| 2.8.2.1.1. NORMALIZACIÓN CLÍNICA | 214 |
| 2.8.2.1.2. SEVERIDAD | 215 |
| 2.8.2.1.3. SUBTIPO TDAH | 216 |
| 2.8.2.1.4. COMORBILIDAD | 218 |
| 2.8.2.1.5. CASO (TDAH) VS CONTROL | 218 |
| 2.8.2.1.6. RESPUESTA METILFENIDATO | 220 |
| 2.8.2.1.6.1. Test alelos SNPs y VNTRs Buena vs Mala Respuesta | 220 |
| 2.8.2.1.6.2. Test alelos tratados con MTF vs tratados con MTF + Otro fármaco | 221 |
| 2.8.2.1.6.3. Test asociación genotipo DRD4 VNTR 7R/SLC6A4 LL con respuesta a MTF | 222 |
| 2.8.2.1.7. RESPUESTA A ATOMOXETINA | 223 |
| 2.8.2.1.7.1. Metabolizadores Ultrarrápidos + Normales vs Intermedios + Lentos | 223 |
| 2.8.2.1.7.2. Metabolizadores Ultrarrápidos vs Normales + Normales o Intermedios + Intermedios + Lentos | 224 |
| 2.8.2.1.7.3. Metabolizadores Lentos vs Ultrarrápidos + Normales + Intermedios | 225 |
| 2.8.2.2. ANÁLISIS UNIVARIANTE DE ASOCIACIÓN: VARIABLES CLÍNICAS | 226 |
| 2.8.3. ANÁLISIS MULTIVARIANTE | 229 |
| 2.8.3.1. NORMALIZACIÓN CLÍNICA | 229 |

| | |
|---|------------|
| 2.8.3.1.1 MODELO HACIA DELANTE | 229 |
| 2.8.3.1.2. MODELO HACIA ATRÁS | 232 |
| 2.8.3.2. SEVERIDAD | 236 |
| 2.8.3.3. SUBTIPO TDAH | 237 |
| 2.8.3.3.1. Subtipo inatento versus hiperactivo/ impulsivo + combinado..... | 237 |
| 2.8.3.3.2. Subtipo combinado versus hiperactivo/ impulsivo + inatento | 238 |
| 2.8.3.4. COMORBILIDAD | 239 |
| 2.8.3.5. CASO (TDAH) VS CONTROL | 239 |
| V. DISCUSIÓN | 241 |
| 1. ELECCIÓN DEL TIPO DE ESTUDIO Y LIMITACIONES ASOCIADAS | 245 |
| 2. ESTUDIO PILOTO: DISEÑO Y DESARROLLO DE UN CHIP DE GENOTIPADO | 249 |
| 3. ESTUDIO COMPLETO DE ASOCIACIÓN | 250 |
| 3.1. DIAGNÓSTICO: TDAH VS CONTROL | 250 |
| 3.2. FENOTIPOS ASOCIADOS A TDAH | 256 |
| 3.2.1. NORMALIZACIÓN CLÍNICA DE LOS SÍNTOMAS | 256 |
| 3.2.2. SUBTIPO DE TDAH | 260 |
| 3.2.3. SEVERIDAD | 266 |
| 3.2.4. COMORBILIDAD | 269 |
| 3.3. RESPUESTA A ATOMOXETINA | 271 |
| 3.4. RESPUESTA A METILFENIDATO | 272 |
| 3.5. RESUMEN VARIABLES ASOCIADAS | 276 |
| 4. POSIBLES ACCIONES FUTURAS | 277 |
| VI. CONCLUSIONES..... | 279 |
| VII. GLOSARIO..... | 283 |
| VIII. ANEXOS | 291 |
| ANEXO I: CUADERNO RECOGIDA DE DATOS..... | 293 |
| ANEXO II: HOJA DE INFORMACIÓN AL SUJETO Y CONSENTIMIENTO INFORMADO | 304 |

| | |
|--|------------|
| ANEXO III: CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS DE PACIENTES DE TDAH Y CONTROLES SANOS SIN ENFERMEDADES PSIQUIÁTRICAS DIAGNOSTICADAS | 312 |
| ANEXO IV: SECUENCIAS DE LOS CEBADORES UTILIZADOS PARA EL CHIP DE GENOTIPADO Y EL KIT DE DETECCIÓN DE INSERCIONES/DELECCIONES Y VNTRs..... | 325 |
| ANEXO V: OPTIMIZACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS Y VALIDACIÓN TÉCNICA DEL CHIP DE GENOTIPADO | 330 |
| IX. BIBLIOGRAFÍA | 347 |

I. INTRODUCCIÓN

1. EL TRASTORNO DE DÉFICIT DE ATENCIÓN CON HIPERACTIVIDAD

El trastorno por déficit de atención con hiperactividad (**TDAH** ó *ADHD* de su nombre en inglés *Attention Deficit and Hyperactivity Disorder*) es el trastorno neuropsiquiátrico más común en la infancia. Se trata de un trastorno del comportamiento heterogéneo desde un punto de vista clínico y pronóstico, que tiene su inicio en la infancia pero que evoluciona a lo largo de la vida.

Este trastorno, ha sido descrito popularmente desde la antigüedad habiendo quedado reflejado a través de numerosos documentos literarios y artísticos. Personajes históricos como Thomas Edison, Leonardo Da Vinci y Albert Einstein, entre muchos otros, han sido citados por exhibir el comportamiento clásico de una persona con TDAH. Sin embargo, la primera referencia científica al trastorno es más difícil de señalar. Se ha postulado a Heinrich Hoffmann, psiquiatra y escritor alemán, como el primer autor que describió inequívocamente a un niño con TDAH a mediados del siglo XIX. En su obra para niños “Der Struwwelpeter” publicada en 1845 (Figura 1) que consta de varias historias narradas en verso, muestra a un niño con “mal comportamiento”, que no es capaz de inhibir sus impulsos, muestra gran hiperactividad y no presta atención.

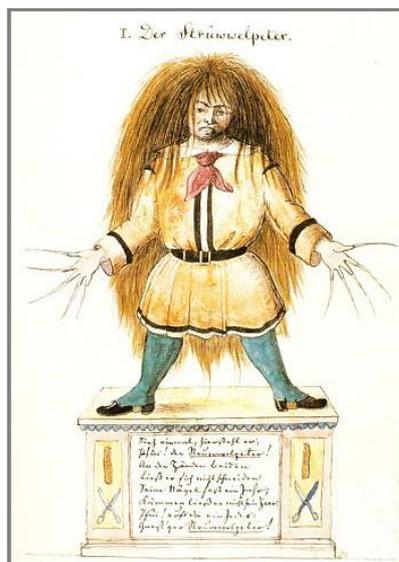


Figura 1.- Ilustración original de la obra literaria *Der Struwwelpeter* de Heinrich Hoffmann (1845), libro que se postula como la primera referencia científica al TDAH, en el que se describe a un niño que padece los síntomas clásicos de este trastorno (falta de atención e hiperactividad).

Después de Hoffmann, son cuantiosos los autores que hacen mención a esta sintomatología, por ejemplo Bourneville en 1897 describe “niños inestables”, caracterizados por una inquietud física y psíquica exagerada y una actitud destructiva a las que se suma un leve retraso mental. Demoor en 1901 también les hace referencia, precisando la dificultad constante de movimiento y el déficit atencional. Mientras que Still en 1902 y Lafora en 1917 describen detalladamente las características clínicas del trastorno, añadiendo las repercusiones sociales y

escolares sobre los pacientes incluso en niños sin déficit intelectual. Tras estas descripciones clínicas, aparecen distintas teorías etiológicas que se suceden hasta mediados del siglo XX, relacionando dichas características clínicas con encefalopatía traumática o como secuela de la encefalitis epidémica entre otras. Shilder en 1931 refiere la hipercinesia en pacientes con antecedentes de sufrimiento perinatal, señalando la base orgánica de esta patología y realizando una observación que perdurará hasta nuestros días. En 1932, Kramer y Pollnow describen el “trastorno hipercinético”, mientras que en 1934 Kahn y Cohen proponen el término “síndrome de impulsividad orgánica” que es sustituido en 1942 por Clements y Peters por el de “síndrome de disfunción cerebral mínima”. Para finalmente, a partir de 1970, ser sustituido por el término de “trastorno por déficit de atención con hiperactividad” en base a los criterios de la Asociación Americana de Psiquiatría (AAP) y quedando recogido como tal en el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, actualmente en su cuarta edición revisada (**DSM-IV-TR**) o como “trastornos hipercinéticos”, en la Clasificación Internacional de Enfermedades, décima edición (CIE-10). En 1994 se actualizaron los criterios diagnósticos del TDAH y se definieron los subtipos que se siguen utilizando actualmente: el subtipo inatento, el hiperactivo/impulsivo y el combinado que serán descritos más adelante. En referencia al tratamiento farmacológico que se aplica en el TDAH, la primera referencia literaria que se conoce sobre un tratamiento específico con psicoestimulantes en niños con déficits atencionales y problemas comportamentales la comunica Bradley en 1937 (Herreros et al. 2002).

La descripción clínica del TDAH a principios del siglo XX se centró exclusivamente en niños y tuvieron que pasar más de 70 años hasta que, a partir de 1976 se publicaran los primeros trabajos que anunciaran la validez diagnóstica de este trastorno en adultos (Ramos-Quiroga et al. 2006). En la actualidad, está aceptado que este trastorno se presenta también en adultos y cada vez más son más las investigaciones que se centran en esta población, ya que presentan características diagnósticas, sintomatológicas, de presencia de comorbilidades y respuesta a tratamiento propias y diferenciales de la población infanto-juvenil, como se comentará en el apartado de sintomatología.

1.1. DESCRIPCIÓN CLÍNICA

1.1.1. SINTOMATOLOGÍA

Los pacientes con TDAH tienen dificultades en la atención mantenida y no terminan las tareas asignadas, distrayéndose frecuentemente. Además, pueden mostrar comportamientos impulsivos, tener una actividad excesiva e inapropiada en el contexto en que se encuentran, y presentar una gran dificultad para inhibir sus impulsos. Estas tres características (hiperactividad, impulsividad e inatención) se encuentran estrechamente relacionadas y lo más frecuente es que los sujetos diagnosticados con TDAH las presenten todas en mayor o menor grado, variando

además según su edad y grado de desarrollo (Dopheide y Pliszka 2009). Todos estos síntomas afectan gravemente a la vida social, académica y laboral del individuo.

Se han descrito diferencias en relación al sexo, ya que parece que este trastorno presenta una menor incidencia en niñas, siendo éstas predominantemente de tipo inatento. De hecho los puntos de corte que se utilizan para diagnosticar el TDAH en las escalas neuropsicológicas son diferentes para niños y niñas (Servera y Cardo 2007). Sin embargo, en estudios realizados en población adulta la prevalencia entre varones y mujeres se iguala o incluso llega a descompensarse, lo que podría indicar la existencia de sesgos diagnósticos, ya que los síntomas de inatención en las niñas pasarían más desapercibidos que los hiperactivos-impulsivos en los niños.

Como se ha comentado anteriormente, la sintomatología varía a lo largo de la vida. Estudios de seguimiento indican que los niños con TDAH tienen un menor rendimiento escolar, repiten curso con más frecuencia y tienen 3 veces más probabilidades de ser expulsados del colegio (Benito-Moraga 2008), siendo también proclives a sufrir un mayor número de accidentes y más graves.

En la adolescencia y juventud estos problemas escolares y la tendencia a sufrir accidentes continúan, pero además muestran más conductas delictivas (un 48% de arrestos en estos pacientes frente a un 20% en grupo control). Surgen también nuevas conductas peligrosas, como el abuso de sustancias y relaciones sexuales de riesgo. Estos pacientes tienen más probabilidades de haber mantenido sus primeras relaciones sexuales antes de los 15 años. Además, suelen tener más parejas sexuales y utilizan menos métodos anticonceptivos, por lo que las enfermedades de transmisión sexual y los embarazos durante la adolescencia se presentan también con mayor frecuencia que en el resto de la población (Benito-Moraga 2008).

Todos estos factores suponen un importante obstáculo para el desarrollo y la maduración del individuo. Si además, los síntomas de inatención e hiperactividad persisten durante la vida adulta, como ocurre en un 50%-40% de los casos, se habla de una prevalencia de la enfermedad en la población adulta de entre el 3% y el 4%, aumentan considerablemente los problemas sociolaborales y de mantenimiento de la estabilidad emocional (Benito-Moraga 2008). Los adultos con TDAH están menos satisfechos con sus vidas, cambian más veces de pareja y de trabajo y sufren más problemas psicológicos (baja autoestima, ansiedad, depresión, estrés...) (Valdizan y Izaguerri-Gracia 2009), sin mencionar las comorbilidades frecuentes en este trastorno de las que hablaremos más adelante. Las manifestaciones clínicas que aparecen de forma característica en los adultos son: dificultad en la concentración, memoria limitada a corto plazo y poca memoria en general, desorganización, impulsividad, frustración, baja autodisciplina y habilidades sociales disminuidas. Los pacientes adultos con TDAH suelen manifestar

principalmente síntomas de inatención y de impulsividad ya que se ha descrito que la hiperactividad disminuye con la edad y se restringe a un sentimiento más subjetivo de inquietud.

Además de todo ello, hoy en día los casos de TDAH en población adulta están infradiagnosticados, ya que durante mucho tiempo se ha creído que era un trastorno únicamente propio de niños y adolescentes, por lo que no reciben el tratamiento adecuado y la sintomatología está muy presente (Valdizan y Izaguerri-Gracia 2009).

La Figura 2 muestra un dibujo esquemático de la evolución clínica del TDAH a lo largo de la vida, comenzando en la niñez y finalizando en la edad adulta. Se cita la sintomatología clínica característica y los problemas asociados en cada etapa en los recuadros superiores e inferiores.

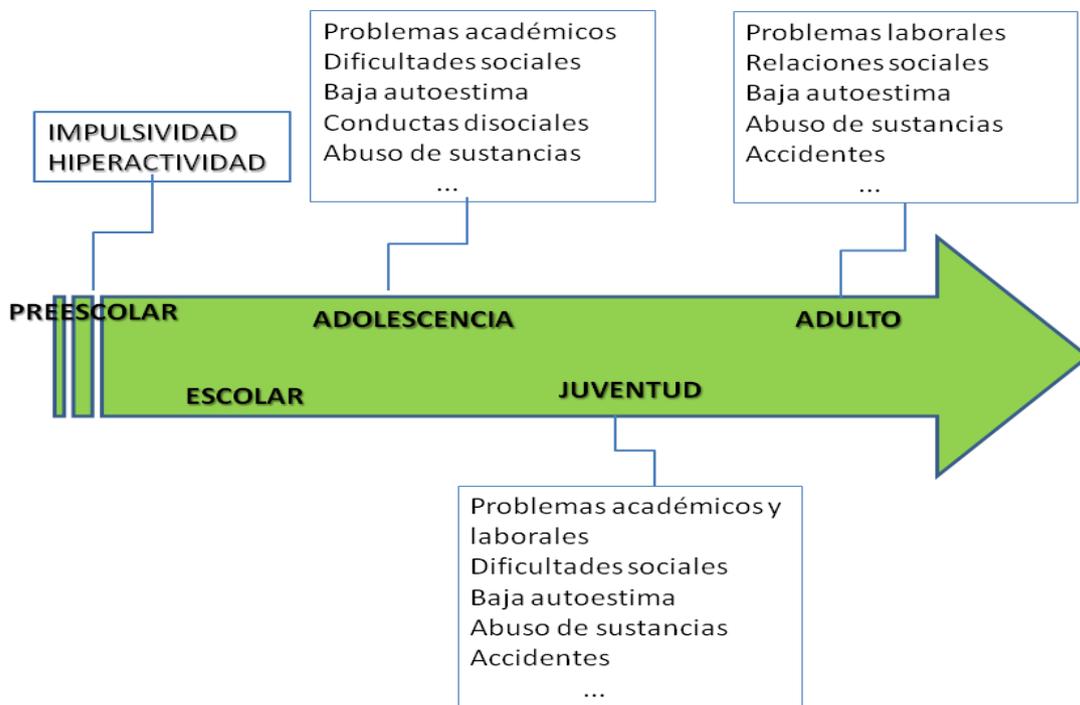


Figura 2.- Evolución clínica del TDAH a lo largo de la vida. Adaptado de Buitelaar et al. 2003.

Además de la evolución que experimenta a lo largo de la vida, se trata de un trastorno clínicamente muy heterogéneo. No está únicamente determinado por la diferente severidad de la sintomatología que ha sido descrita previamente, si no que son muy frecuentes los trastornos comórbidos como se describirán más adelante en el apartado 1.1.4 (Steinhausen 2009). Del mismo modo, es importante destacar que las manifestaciones clínicas y evolución de esta sintomatología están influenciadas además por factores ambientales y sociales. Factores tan diversos como una difícil situación familiar, bajo nivel sociocultural, una alimentación concreta o incluso unas condiciones determinadas en el parto se han descrito como asociadas a un mayor riesgo de padecer TDAH o con una mayor severidad y peor evolución de la sintomatología (Biederman 2005).

Esta heterogeneidad en las manifestaciones clínicas así como la presencia de distintas comorbilidades en distintos pacientes podría sugerir que dentro del diagnóstico de TDAH se están incluyendo en la actualidad distintos procesos con mecanismos patogénicos próximos pero diferentes. Quizá si fuésemos capaces de diferenciar entre estos grupos de pacientes se les podría aplicar un tratamiento específico en cada caso y el pronóstico mejoraría.

1.1.2. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de TDAH se basa en el examen de las características clínicas y del historial familiar del individuo, habiéndose convertido en un diagnóstico de exclusión de otras patologías, no existiendo en la actualidad ningún parámetro físico-químico medible que facilite y asegure dicho diagnóstico, a pesar de ser considerada por la AAP como una enfermedad de origen neurológico. Tampoco se conoce ningún parámetro clínico o prueba analítica que permita predecir cuál va a ser la progresión del niño a partir del momento del diagnóstico ni si va a desarrollar o no comorbilidades o cuál va a ser su respuesta al tratamiento recibido (Faraone et al. 1998; Herreros et al. 2002).

En condiciones ideales, y ya que no existe una prueba diagnóstica concluyente, se seguiría un protocolo diagnóstico en el que primero se realizaría una entrevista con los padres y el niño/paciente adulto, en la que se tratan cuestiones como la edad de comienzo, evolución de la sintomatología, antecedentes personales (enfermedades neurológicas, embarazo y parto...), antecedentes familiares de TDAH u otros trastornos psiquiátricos y de la situación social y familiar del individuo. Posteriormente, se realizaría una exploración física completa que incluiría un examen neurológico completo. A continuación, se realizaría una evaluación complementaria en la que se hablaría con profesores, se analizaría el rendimiento escolar, se evaluaría el coeficiente intelectual y se realizarían una serie de estudios psicológicos e incluso neurorradiológicos-analíticos según sospecha. Se realizaría un diagnóstico etiológico en el que se trataría de identificar si existe un origen orgánico de la patología o se trata de un trastorno idiopático. Finalmente, se realizaría el diagnóstico diferencial con otros trastornos médicos, neurólogos y factores ambientales.

Sin embargo el diagnóstico planteado de esta forma es inviable para la aplicación rutinaria en clínica por el tiempo, esfuerzo y costes económicos que ello implicaría, por lo que para la orientación diagnóstica y su clasificación, los clínicos emplean generalmente los criterios descritos en el manual DSM-IV-TR para, entrevistándose con el paciente y sus padres, poder realizar el diagnóstico. También se utiliza el manual CIE-10, aunque éste muestra una menor universalización y empleo, lo que dificulta la comparación con otros estudios.

A continuación, se muestran los criterios diagnósticos para el TDAH tal y como se describen en el DSM-IV-TR, donde los síntomas se dividen en 2 grupos: Desatención que consta de 9 ítems e Hiperactividad e Impulsividad juntos, que ambos suman 9 ítems también. Según el

manual DSM-IV-TR, deben presentarse 4 o más síntomas de los descritos, durante al menos 6 meses y algunos de ellos ya presentes antes de los 7 años, en dos o más ambientes (por ejemplo en la escuela y en casa). Deben existir pruebas de un deterioro social/académico y que todo esto no pueda ser explicado por otros trastornos. Por definición, el diagnóstico de TDAH no puede hacerse si los síntomas suceden en presencia de un trastorno generalizado del desarrollo, esquizofrenia u otro trastorno psicótico, o si se adaptan mejor a otro trastorno psiquiátrico. En los próximos años entrará en vigor la nueva versión de este manual diagnóstico, el DSM-V y algunos de estos criterios se pueden ver modificados de alguna forma, por ejemplo, se ha propuesto aumentar el número de síntomas de impulsividad o eliminar el síndrome autista o el trastorno generalizado del desarrollo como criterios excluyentes de TDAH.

Los criterios diagnósticos actuales son los siguientes (DSM-IV-TR, puntos A-E):

A.1. Seis o más de los siguientes síntomas de desatención han persistido por lo menos durante 6 meses con una intensidad que es desadaptativa e incoherente en relación con el nivel de desarrollo:

Falta de atención

- a. a menudo no presta atención suficiente a los detalles o incurre en errores por descuido en las tareas escolares, en el trabajo o en otras actividades
- b. a menudo tiene dificultades para mantener la atención en tareas o en actividades lúdicas
- c. a menudo parece no escuchar cuando se le habla directamente
- d. a menudo no sigue instrucciones y no finaliza tareas escolares, encargo u obligaciones en el centro de trabajo (no se debe a comportamiento negativista o a incapacidad para comprender las instrucciones)
- e. a menudo tiene dificultad para organizar tareas y actividades
- f. a menudo evita, le disgusta o es renuente en cuanto a dedicarse a tareas que requieren un esfuerzo mental sostenido (como trabajos escolares o domésticos)
- g. a menudo extravía objetos necesarios para tareas o actividades (como juguetes, trabajos escolares, lápices, libros o herramientas)
- h. a menudo se distrae fácilmente por estímulos irrelevantes
- i. a menudo es descuidado en las actividades diarias

A.2. Seis o más de los siguientes síntomas de hiperactividad-impulsividad han persistido por lo menos durante 6 meses con una intensidad que es desadaptativa e incoherente en relación con el nivel de desarrollo:

Hiperactividad

- a. a menudo mueve en excesos las manos o los pies o se remueve en el asiento
- b. a menudo abandona su asiento en la clase o en otras situaciones en las que es inapropiado hacerlo
- c. a menudo corre o salta excesivamente en situaciones en las que es inapropiado hacerlo (en los adolescentes o adultos puede limitarse a sentimientos subjetivos de inquietud)
- d. a menudo tiene dificultades para jugar o dedicarse tranquilamente a actividades de ocio
- e. a menudo 'está en marcha' o actúa como si 'tuviera un motor'
- f. a menudo habla en exceso

Impulsividad

- g. a menudo precipita respuestas antes de haber sido completadas las preguntas
- h. a menudo tiene dificultades para guardar turno
- i. a menudo interrumpe o se inmiscuye en las actividades de otros (p. ej., se entromete en conversaciones o juegos)

B. Algunos síntomas de hiperactividad-impulsividad o de desatención que causaban alteraciones estaban presentes antes de los 7 años de edad.

C. Algunas alteraciones provocadas por los síntomas se presentan en dos o más ambientes (p. ej., en la escuela [o en el trabajo] y en casa).

D. Deben existir pruebas claras de un deterioro clínicamente significativo de la actividad social, académica o laboral.

E. Los síntomas no aparecen exclusivamente en el transcurso de un trastorno generalizado del desarrollo, esquizofrenia u otro trastorno psicótico y no se explican mejor por la presencia de otro trastorno mental (p. ej., trastorno del estado de ánimo, trastorno de ansiedad, trastorno disociativo o trastorno de la personalidad).

Existen varias escalas neuropsicológicas validadas para el diagnóstico del TDAH de uso común en clínica que se basan en los criterios del DSM-IV-TR anteriormente descritos. Las más aplicadas en la actualidad son: *Conners Adult ADHD Diagnostic Interview for DSM-IV*, Entrevista para TDAH de Barkley, *ADHD Rating Scale-IV* y *ADHD Symptom Rating Scale*. Todas ellas sitúan puntos de corte diagnósticos diferentes para niños y niñas, también hacen distinciones según la edad del paciente, ya que la sintomatología asociada a la hiperactividad se ha descrito que disminuye con la edad (DuPaul et al. 1998a). A continuación, la Tabla 1 muestra una escala de calificación ADHD-IV-versión del progenitor a modo de ejemplo de este tipo de escalas. En este caso, la contestaría directamente el progenitor/tutor del menor que se sospeche que pudiera padecer el trastorno, evaluando si ese comportamiento se da nunca, rara vez, algunas veces, con frecuencia o con mucha frecuencia en su hijo/tutelado. Finalmente se sumarían los puntos obtenidos individualmente y se evaluaría en función del sexo y la edad si ese individuo es diagnosticado o no con TDAH. Si se tratara de un adulto se le ofrecería una versión similar pero autoaplicada, es decir, la contestaría el mismo individuo.

En un pequeño porcentaje de los casos diagnosticados puede existir una patología concreta que esté justificando de forma directa el comportamiento observado, por ejemplo en la encefalopatía postraumática o la resistencia generalizada a la hormona tiroidea. Se consideraría en estos casos que el TDAH es de base orgánica y se les prestaría un tratamiento específico (en estos pacientes la respuesta a estimulantes es menor) al mismo tiempo que presentarían un pronóstico comportamental y atencional diferente al de los casos de TDAH idiopático en los que la causa es desconocida. Algunos autores creen que el término TDAH debería aplicarse exclusivamente al de naturaleza idiopática pero actualmente engloba a ambos.

Una vez más, la dificultad diagnóstica nos podría estar indicando que actualmente se están agrupando diferentes condiciones patológicas próximas pero diferentes. En la edad adulta es más difícil, si cabe, el diagnóstico de TDAH e incluso, como se ha mencionado anteriormente, hasta hace poco se cuestionaba su existencia (Valdizan y Izaguerri-Gracia 2009). Los síntomas descritos en los criterios del manual DSM-IV-TR no siempre pueden ser identificados claramente en el adulto, ya que la hiperactividad puede ser considerada como un rasgo de la personalidad y

no como un problema a tratar. De hecho, muchos pacientes que no fueron tratados de niños llegan a la consulta a partir de ser diagnosticado alguno de sus hijos con el trastorno o por complicaciones con trastornos comórbidos. Además, de acuerdo con el nivel de inteligencia de cada individuo, se pueden haber desarrollado estrategias compensatorias que enmascaren el trastorno o los propios trastornos comórbidos son los que enmascaran los síntomas de TDAH (Valdizan y Izaguerri-Gracia 2009).

Tabla 1.- ADHD Rating Scale-IV de Calificación de ADHD-IV-Versión del Progenitor: administrada y calificada por el investigador. Test que se les pasa a los progenitores de los niños de los que se sospecha que padecen TDAH. En la ADHD rating scale-IV, los criterios son adaptados del DSMIV-TR. El progenitor rellena los diferentes puntos en base al comportamiento del niño en los últimos 4 meses. Los síntomas de desatención se corresponden con los números impares y los síntomas hiperactivos/impulsivos están representados por los números pares. Los puntos de corte para diagnosticar TDAH varían según la edad y el sexo y son específicos para cada escala. Existen versiones autoaplicadas para los pacientes mayores de edad así como versiones del progenitor y del profesor.

| ¿En qué medida han molestado a su hijo desde la última visita? | Nunca o rara vez | Algunas veces | Con frecuencia | Con mucha frecuencia |
|---|------------------|---------------|----------------|----------------------|
| 1. No presta mucha atención a detalles o comete errores por descuido, en tareas escolares | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 2. Juega con manos o pies o se retuerce en su silla | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 3. Tiene dificultades en mantener la atención en tareas o actividades de juego | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 4. Abandona su asiento en la clase o en otras situaciones en que debe permanecer sentado | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 5. No parece escuchar cuando se le habla directamente | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 4. Corretea o trepa excesivamente en situaciones en que es inapropiado | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 7. No sigue por completo las instrucciones y falla en terminar el trabajo | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 8. Tiene dificultad jugando o participando en actividades de diversión en forma callada | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 9. Tiene dificultad organizando tareas y actividades | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 10. Está "siempre en movimiento" o actúa como si estuviese "movido por un motor" | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 11. Evita tareas (ej: en la escuela o en casa) que requieren un esfuerzo mental sostenido | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 12. Habla excesivamente | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 13. Pierde cosas necesarias para sus actividades o tareas | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 14. Da respuestas a tontas y a locas antes de que las preguntas sean completadas | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 15. Se distrae fácilmente | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 14. Tiene dificultad esperando turno | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 17. Es olvidadizo en sus actividades diarias | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 18. Se entromete o interrumpe a otros | 0 | 1 | 2 | 3 |

1.1.3. SUBTIPOS DE TDAH

Según los criterios diagnósticos recogidos en el manual diagnóstico DSM-IV-TR se distinguen tres subtipos para el diagnóstico del trastorno, el subtipo con predominio hiperactivo-impulsivo, el subtipo con predominio de déficit de atención (o inatento) y el subtipo combinado en el que están presentes síntomas de los dos subtipos anteriores (Herreros et al. 2002).

Los comportamientos derivados de estas características se encuentran altamente influenciados por la edad del paciente, ya que no es infrecuente que un niño a lo largo de su evolución pase de un subtipo a otro. Por ejemplo, es común que un paciente diagnosticado con TDAH con subtipo combinado evolucione a un subtipo predominantemente impulsivo a medida que se desarrollan estrategias para focalizar su atención, o que con la edad remita el componente hiperactivo lo que hace que disminuyan el número de casos de subtipo combinado y aumente el de inatentos (Dafny y Yang 2006).

Los pacientes diagnosticados como subtipo inatento, presentan características ansiosas, de miedo y aprensión, y suelen ser confusos y poco atentos, lo que les lleva a una pérdida importante de información. En las instrucciones orales o escritas cometen errores, pero que no son debidos a la precipitación. Se les relaciona con problemas de memoria pero en general no correlacionan con ningún tipo de disfunción cognitiva y sus cocientes intelectuales son similares a los de sus contemporáneos. No suelen presentar comportamientos agresivos y tienen menos problemas en establecer relaciones sociales que los sujetos pertenecientes a los otros subtipos (Barkley 1998). La inatención incluye nueve síntomas, que son: incapacidad para prestar atención o tener cuidado con los errores, dificultad para mantener la atención, no escuchar, no finalizar, tener dificultad para organizarse, rechazo ante esfuerzos mentales sostenidos, perder cosas, ser fácilmente distraíble y facilidad para los olvidos (Herreros et al. 2002).

Los pacientes pertenecientes al subtipo predominantemente hiperactivo-impulsivo, por el contrario, suelen presentar mayores dificultades para relacionarse y establecer vínculos con sus compañeros debido a las características propias de este grupo. Se muestran inquietos, no pueden permanecer sentados en situaciones que se espera que lo hagan (colegio), corren, trepan de forma excesiva, hablan igualmente de manera excesiva mostrando grandes dificultades para permanecer callados y actividad motora constante y muchas veces también comportamientos agresivos. La adolescencia puede ser especialmente problemática para este subtipo al interactuar con conductas antisociales (Barkley 1998). La hiperactividad incluye seis síntomas: inquietud, moverse del asiento, correr o trepar excesivamente, tener dificultades para jugar quieto, estar siempre "como si tuviera un motor" y hablar en exceso. Por otro lado, los tres criterios sintomáticos de la impulsividad son: responder sin pensar, tener dificultad para esperar el turno e interrumpir y molestar a los demás con frecuencia (Herreros et al. 2002).

En relación al perfil combinado, solamente indicar que se encuentra implicada la sintomatología propia de los dos subtipos anteriores. Lo más frecuente es que los sujetos diagnosticados de TDAH los presenten todos en mayor o menor grado, aunque los comportamientos derivados de estas características se encuentran altamente influenciados por la edad y el grado de desarrollo del sujeto por lo que, como se ha indicado anteriormente, pueden variar a lo largo de la vida y con el tratamiento.

Una vez más, esta heterogeneidad en las manifestaciones clínicas y la subdivisión en distintos subtipos podría sugerir que dentro del diagnóstico de TDAH se están incluyendo en la actualidad distintos procesos con mecanismos patogénicos cercanos pero diferentes. De hecho, hay indicios que parecen indicar que la clasificación en estos tres subtipos podría ser diferente en la próxima versión DSM-V, ya que se ha propuesto dejar como diagnóstico de TDAH únicamente al subtipo combinado y asignar como trastornos diferentes a lo que actualmente se conocen como subtipo inatento e hiperactivo/impulsivo.

1.1.4. COMORBILIDAD PSIQUIÁTRICA

Como se ha mencionado en el apartado anterior acerca de la sintomatología característica del TDAH, es importante destacar que la comorbilidad con otro tipo de trastornos psiquiátricos en pacientes con TDAH es muy frecuente. Se estima en torno al 30% de los casos, lo que empeora el pronóstico de evolución de dichos pacientes. Además, el 47% de los individuos con comorbilidad muestran más de un trastorno comórbido (Artigas-Pallarés 2002; Shaw et al. 2007a), siendo estos trastornos en ocasiones más incapacitantes que el propio TDAH y siempre de suma importancia para el tratamiento y evolución del paciente, ya que requieren una atención especial (Díaz Atienza 2006). Desde el punto de vista psiquiátrico, el tratamiento de los casos con patología comórbida es más complejo que el de aquéllos con TDAH como trastorno único y a veces, con peores resultados finales. Se deben hacer modificaciones farmacológicas importantes que en muchas ocasiones supone tener que optar por tratamientos de segunda o tercera línea en el tratamiento del TDAH. Al mismo tiempo se ha visto que la presencia de trastornos psiquiátricos es más frecuente en pacientes de TDAH que la proporción en la población en general (Cumyn et al. 2009).

Hasta tal punto el TDAH presenta otros trastornos asociados, que muchos investigadores se han llegado a cuestionar la existencia real del propio TDAH, indicando que podría tratarse de un conjunto de condiciones patológicas que comparten una serie de subgrupos etiológicos cuya evolución podría ser diferente (Díaz Atienza 2006); esto iría en consonancia con los cambios propuestos para el DSM-V.

Sin embargo, conviene diferenciar entre comorbilidad, síntomas secundarios y complicaciones propias del TDAH. No es lo mismo un niño con una depresión comórbida, es decir, que además de TDAH muestre tristeza, llanto fácil y problemas para dormir, que un niño

que debido a la sintomatología propia del TDAH, es rechazado por sus compañeros de clase y sufre por ello. Esto último sería una reacción adaptativa secundaria (Spencer 2006). Además, a veces la comorbilidad es una consecuencia/complicación del propio TDAH. Es conocido que en la evolución del TDAH hay un mayor riesgo de desarrollar un trastorno disocial, consumo de drogas o trastornos de la personalidad (Bukstein 2009).

Las verdaderas comorbilidades descritas más frecuentemente son: trastornos del aprendizaje, de ansiedad, afectivos, de conducta, tics y síndrome de Gilles de la Tourette y abuso de sustancias entre otras (Bukstein 2009; Artigas-Pallarés 2003; Spencer 2006). En la Figura 3 se muestran de forma esquemática algunos de los principales trastornos comórbidos que se describieron para una población de niños y niñas diagnosticados con el subtipo combinado de TDAH. A los trastornos de conducta junto con las dificultades en el aprendizaje escolar se les atribuye la repercusión más negativa sobre el tratamiento del TDAH y la evolución del paciente (Artigas-Pallarés 2003).

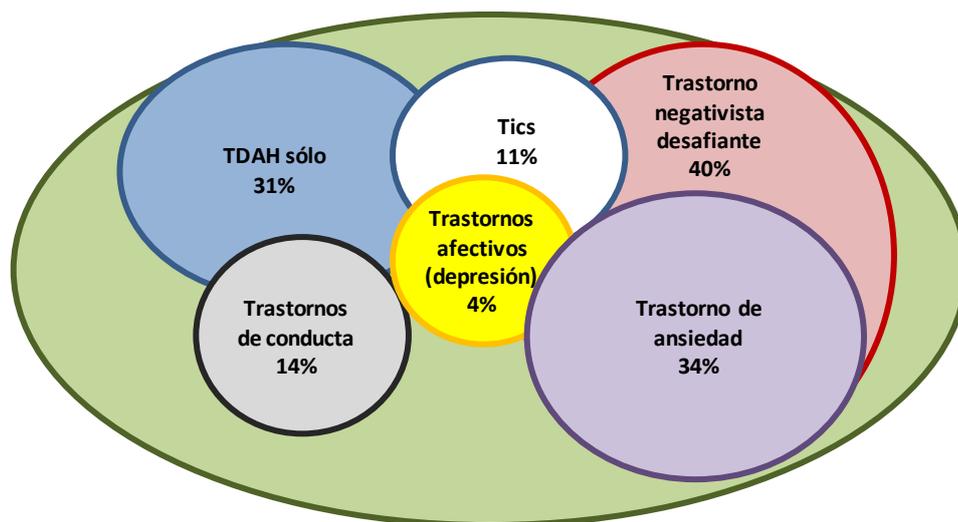


Figura 3.- Gráfico en el que aparecen representados algunos de los trastornos que más frecuentemente aparecen comórbidos al TDAH así como los porcentajes en los que se presentan: tics, trastorno de conducta, trastorno de ansiedad, trastorno afectivo y trastorno negativista desafiante, adaptado de Jensen et al. (2001). En este estudio sólo tuvieron en cuenta a niños/as (en proporción 80/20%) con TDAH subtipo combinado, con edades comprendidas entre los 7 y los 9 años.

Aunque la comorbilidad presenta una prevalencia alta en todos los subgrupos de TDAH, por las investigaciones que se han realizado hasta el momento, parece que el subtipo combinado es el que conlleva una mayor variedad, especialmente con los trastornos disociales, el trastorno negativista desafiante y los trastornos ansioso-depresivos (Díaz Atienza 2006).

El tipo de comorbilidad presente también se ha asociado al sexo en diversos estudios realizados principalmente con adolescentes y adultos. Por ejemplo, en el estudio llevado a cabo por Cumyn y colaboradores en una población de adultos diagnosticados con TDAH se encontró que, mientras que los varones son más susceptibles de presentar trastornos de personalidad, comportamientos antisociales y mayores tasas de abuso de drogas, las mujeres presentan tasas más altas de trastorno de pánico, trastornos alimenticios como anorexia y bulimia y trastorno límite de la personalidad (Cumyn et al. 2009).

El número y tipo de comorbilidades presentes puede variar con la edad y con la evolución del paciente. Por ejemplo, en la adolescencia es cuando principalmente se desarrollan abusos de sustancias, mientras que la población adulta muestra en general una mayor presencia de comorbilidades que la población infantil (Valdizan y Izaguerri-Gracia 2009).

Además de las comorbilidades, existe un grupo de trastornos que resulta interesante mencionar por su relación con el TDAH, que es el de los **fenotipos conductuales** con TDAH. Los fenotipos conductuales representan la conducta entendida desde la biología. Es un concepto relativamente moderno y se ha desarrollado a partir de los avances realizados en el campo de la Genética molecular. Flint y Yule en 1994 definieron el **fenotipo conductual** como un patrón característico de alteraciones (cognitivas, motoras, sociales y lingüísticas) que se asocian de forma consistente a un trastorno concreto (Artigas-Pallarés 2002). En el caso de los conocidos como fenotipos conductuales con TDAH, se trata de un conjunto de trastornos genéticos que comparten las características de tener retraso mental y un TDAH muy relevante. Cada uno de ellos tiene además un fenotipo conductual y físico propio. Los más comunes son el Síndrome de X frágil, el síndrome de Agelman, el síndrome de Williams, el síndrome velocardio facial y el síndrome de Prader-Willi. Y debido a su elevada frecuencia se deben incluir también en este grupo al síndrome alcohólico fetal y los efectos fetales del alcohol (Artigas-Pallarés 2002).

Por último, algunos investigadores afirman que, al menos en parte, la comorbilidad podría ser en realidad un artefacto conceptual derivado de la forma en la que se han definido los trastornos en el DSM-IV (Elia et al. 2009c). Puesto que el substrato biológico no es unitario ni está delimitado en muchos trastornos, las definiciones y criterios diagnósticos se basan en realidades observables que se han intentado clasificar. Sin embargo, las definiciones varían a lo largo del tiempo y no se aceptan universalmente, sin mencionar el hecho de que tanto el TDAH como la mayoría de los trastornos a los que se asocia no son entidades discretas, sino que se trata de dimensiones conductuales que se distribuyen según un modelo continuo donde a veces es difícil establecer los límites (Artigas-Pallarés 2003).

1.2. EPIDEMIOLOGÍA

El TDAH, como se ha comentado, es el trastorno neuropsiquiátrico más común en la infancia, teniendo una prevalencia descrita del 8 al 12% de la población infanto-juvenil en todo el mundo (Ribases et al. 2008), de los cuales más del 50% mantiene los síntomas en la edad adulta (Ramos-Quiroga et al. 2006). Las diferencias en los porcentajes se deben principalmente a diferencias poblacionales, metodológicas y de criterios diagnósticos. Por ejemplo, se describe una menor prevalencia en países menos desarrollados pero posiblemente no sea debido a que la prevalencia real del trastorno sea menor en estos países, si no a que el TDAH está siendo infradiagnosticado. A su vez, es el primer trastorno psiquiátrico en ser diagnosticado y tratado específicamente en niños (Biederman 1992). En la última década ha aumentado notablemente el número de pacientes diagnosticados con TDAH a nivel mundial y como es lógico, ha aumentado también el interés científico y social sobre este trastorno, así como han crecido exponencialmente los estudios sobre posibles marcadores genéticos, tratamientos y evolución de estos pacientes (Nemoda et al. 2009).

En adultos, la prevalencia descrita y aceptada actualmente es en torno a un 4% a nivel mundial. Sin embargo, hay autores que defienden que esta prevalencia es en realidad más alta y que se debe probablemente a que la población adulta se encuentra infradiagnosticada ya que la sintomatología varía respecto a la descrita en la infancia, siendo la hiperactividad el síntoma que más se reduce, como se ha comentado en el apartado de sintomatología (Ramos-Quiroga et al. 2006).

En relación al sexo, tradicionalmente se ha considerado que el TDAH afectaba más a niños que a niñas. Si bien es cierto que el TDAH se diagnostica más veces en individuos de género masculino que femenino (en una proporción estimada de 3:1), esto podría ser debido a que el trastorno se presenta de forma diferente en varones adultos/niños que en mujeres/niñas. Como se ha comentado en el apartado de sintomatología, las niñas tienden a comportamientos más inatentos y los niños muestran más sintomatología de tipo hiperactivo/impulsivo (la proporción es de 4:1 en este subtipo), por lo que las niñas podrían pasar más desapercibidas o confundirse con otro tipo de trastornos como trastornos del aprendizaje o emocionales (Herreros et al. 2002).

1.3. HIPÓTESIS NEUROBIOLÓGICAS DEL TDAH

Actualmente la etiología y fisiopatología del TDAH se conocen parcialmente (Comings et al. 2000a; Tripp y Wickens 2009). A pesar de ello, existen una serie de evidencias que implicarían a unos neurotransmisores en concreto (dopamina (DA), noradrenalina (NA) y serotonina (5HT) principalmente) y a sus vías de señalización en la etiopatogenia del trastorno. Estas evidencias son las siguientes:

- 1) Se ha demostrado que existen diferencias en las dimensiones de los lóbulos frontales, el núcleo caudado y el vermis cerebelar (evidencias morfológicas) entre sujetos diagnosticados con TDAH y sujetos controles sin enfermedades psiquiátricas conocidas.
- 2) Se conoce que los neurotransmisores dopamina, noradrenalina y serotonina están involucrados en las llamadas funciones cognitivas superiores como son, la atención, concentración, motivación, interés y el aprendizaje de nuevas habilidades.
- 3) Además, se ha visto que la disfunción de uno o varios de estos neurotransmisores está implicada en la etiología del TDAH, especialmente si ésta se da en áreas de la corteza prefrontal y de los ganglios basales (Arnsten 2004). Prueba de ello es que el tratamiento con fármacos que aumentan los niveles de estos neurotransmisores ha demostrado ser eficaz con evidencias funcionales en un alto porcentaje de enfermos (Spencer 2000).
- 4) Mediante la utilización de técnicas neuroanatómicas informatizadas se ha sugerido que existe un retraso en la maduración cortical en pacientes de TDAH en comparación con niños sanos y que este retraso es más significativo en la región prefrontal (Shaw et al. 2007a).

En la Figura 4 se muestra un corte sagital de un cerebro humano en el que se identifican las principales vías de señalización que se han implicado en el TDAH. A continuación se van a detallar cada una de las hipótesis que se barajan como implicadas en el desarrollo del TDAH: Hipótesis dopaminérgica, noradrenérgica, serotoninérgica e hipótesis alternativas.

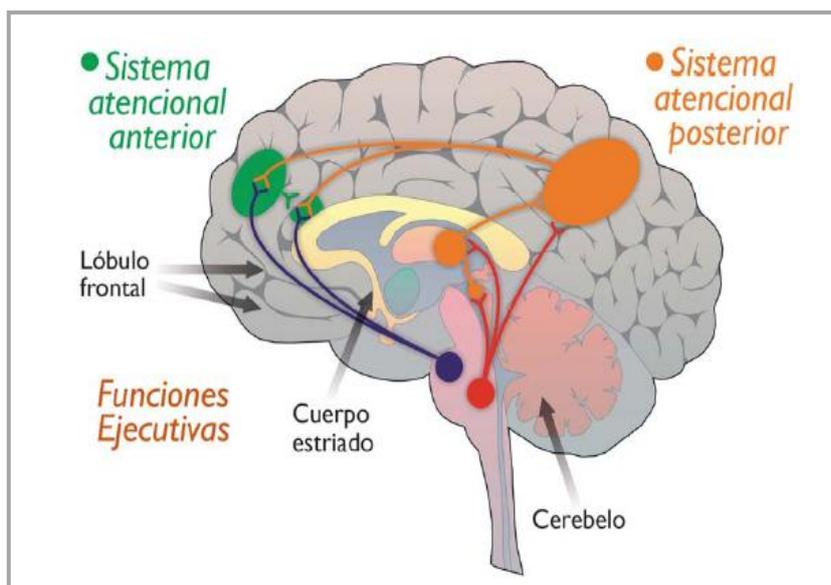


Figura 4.- Esquema adaptado de Himelstein et al. (2000). Se muestra un corte sagital de un cerebro estando marcadas las principales vías de señalización implicadas en el TDAH.

1.3.1. HIPÓTESIS DOPAMINÉRGICA

Como se ha mencionado anteriormente, la DA es uno de los neurotransmisores que se describen como disminuidos en pacientes con TDAH, y la alteración de sus vías de señalización, constituye una de las teorías más aceptadas para explicar la etiopatogenia de este trastorno. La DA es sintetizada en las neuronas dopaminérgicas a partir del precursor tirosina que es transportado al interior de la neurona mediante una bomba transportadora activa, y allí es convertido en DA gracias a la acción de dos enzimas (que también intervienen en la síntesis de NA), la tirosinhidroxilasa (TH) y la dihidroxifenilalanina decarboxilasa (DOPA decarboxilasa ó DDC). Posteriormente, es liberada al espacio sináptico donde interactuará con los receptores de la neurona postsináptica, de los que existen al menos cinco subtipos farmacológicos (DRD1-5) y varias isoformas moleculares más, y parte de ella será recaptada hacia la neurona presináptica por medio de unas proteínas específicas que funcionan como reguladores de retroalimentación negativa, los transportadores de DA (DAT1).

En cuanto a su metabolización, la dopamina es destruida por los mismos enzimas que degradan la NA (una similitud más entre estos dos neurotransmisores), la monoaminoxidasa (MAO) y la catecol-O-metiltransferasa (COMT) (Stephen 2002). En la Figura 5 se muestra de forma esquemática una neurona dopaminérgica estableciendo sinapsis con otra neurona en la corteza prefrontal, región del cerebro en la que abundan este tipo de sinapsis.

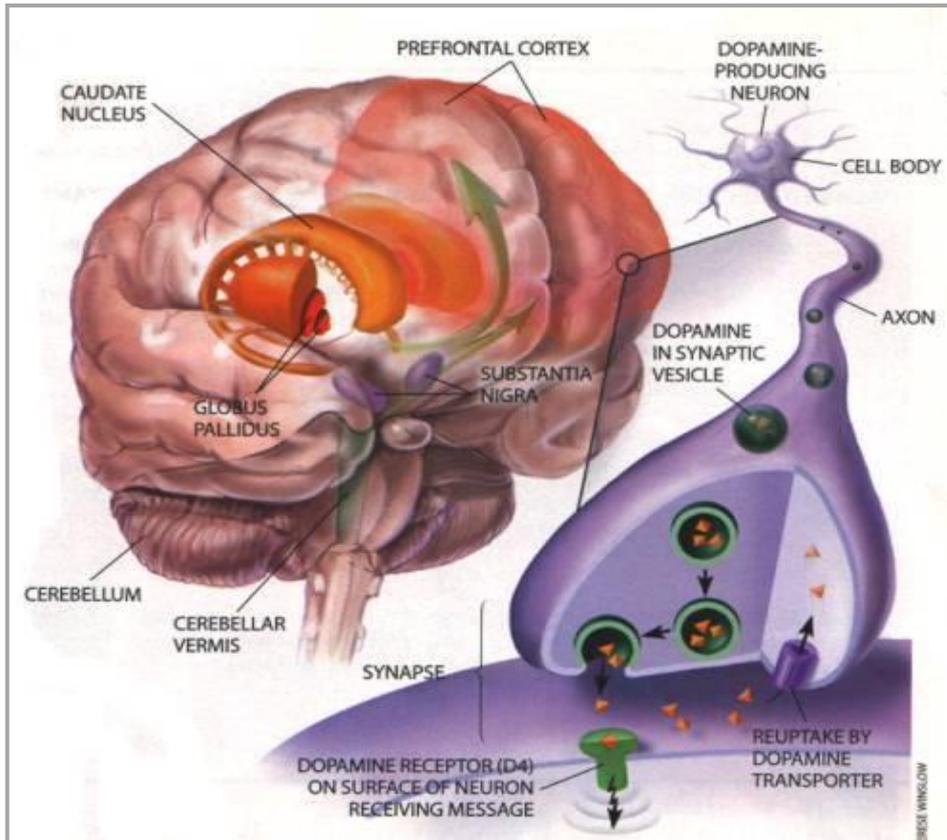


Figura 5.- Dibujo esquemático en el que se muestra una neurona dopaminérgica estableciendo sinapsis con otra en la corteza prefrontal. Se observa la síntesis de DA en la neurona presináptica, su captación en la postsináptica mediante el receptor dopaminérgico DRD4 y un recaptador de DA en la presináptica que capta el neurotransmisor sobrante (DAT1) (Castellanos y Tannock 2002).

Cualquiera de estos receptores, recaptadores o los enzimas de la síntesis/destrucción de la dopamina son potenciales dianas farmacológicas para el tratamiento del TDAH. Se puede aumentar la cantidad de dopamina sintetizada o el tiempo de permanencia en el espacio sináptico, inhibiendo las enzimas que la degradan (MAO y COMT), activando las que la sintetizan (TH y DDC) o bloqueando el recaptador de dopamina.

La hipótesis dopaminérgica del TDAH se apoya principalmente en los siguientes hallazgos (Swanson et al. 2007):

- La lesión de los sistemas dopaminérgicos en ratas se asocia a la presencia de hiperkinesia, déficit de atención y de aprendizaje que mejoran con psicoestimulantes.
- El tratamiento más efectivo para el TDAH es el metilfenidato (psicoestimulante que aumenta los niveles de DA), y el bloqueo de los receptores de DA anula sus efectos terapéuticos.

- Estudios neurorradiológicos funcionales muestran alteraciones en las vías dopaminérgicas; mediante PET (Tomografía de Emisión de Positrones) se ha demostrado el bloqueo directo del transportador de DA con metilfenidato.
- Estudios genéticos demuestran la presencia de inserciones/deleciones y polimorfismos de cambio de nucleótido en los receptores y transportadores de la DA a nivel cerebral, lo que podría implicar variabilidad en la funcionalidad de dichos receptores (Brookes et al. 2006b).

Sin embargo también existen algunos datos contradictorios, como que no todos los agonistas dopaminérgicos sean eficaces en estos pacientes o que incluso en algunos casos los tratamientos psicoestimulantes se asocien a reacciones disfóricas.

1.3.2. HIPÓTESIS NORADRENÉRGICA

La NA también conocida con el nombre de norepinefrina (NE), se sintetiza en el terminal nervioso de las neuronas noradrenérgicas a partir del aminoácido precursor tirosina, que se transporta desde la sangre al sistema nervioso mediante un mecanismo de transporte activo. Una vez dentro, sobre la tirosina actúan secuencialmente tres enzimas: la TH, la DDC y la dopamina- β -hidroxilasa (DBH). La NA resultante se almacena en vesículas sinápticas hasta ser liberada por un impulso nervioso. En estas neuronas la DA es solamente un precursor de la NA. La TH es el enzima limitante de la velocidad de la reacción y el enzima más importante en la síntesis de NA.

Hay dos enzimas que realizan la degradación enzimática de la NA transformándola en metabolitos inactivos: la MAO que se localiza principalmente en las mitocondrias de la neurona presináptica y la COMT que está localizada fuera del terminal nervioso presináptico. Además, existe una bomba de transporte selectiva de NA (NET) que impide que la NA actúe en la sinapsis pero sin destruirla, y puede ser almacenada para actuar en un impulso nervioso posterior o bien ser degradada enzimáticamente.

Las neuronas noradrenérgicas son reguladas por múltiples receptores de NA (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 ...), existiendo subclasificaciones en base a las diferencias moleculares y farmacológicas (Stahl 2002).

La hipótesis noradrenérgica no tiene tantos puntos de apoyo como la dopaminérgica, pero existen ciertas características clínicas/experimentales que la justifican:

- Los psicoestimulantes que se usan para el tratamiento del TDAH activan también vías noradrenérgicas.

- La atomoxetina, inhibidor selectivo del recaptador de NA, obtiene resultados similares al metilfenidato desde el punto de vista terapéutico.
- La eficacia de agonistas directos alfa-adrenérgicos (*clonidina*) se ha descrito en numerosas ocasiones.
- En niños con TDAH se han encontrado unos niveles más bajos de metoxihidroxifenilglicol (MHPG), un metabolito central de la NA, que en niños sanos.
- Tratamientos como los antidepresivos tricíclicos o los inhibidores de la MAO (que tienen efectos adrenérgicos constatados), son útiles en el tratamiento del TDAH.

Sin embargo, los detractores de esta hipótesis afirman que el beneficio que obtienen los pacientes de TDAH con este tipo de tratamientos se deben a su efecto sobre la 5HT o a la mejoría de trastornos comórbidos entre otros, no porque la NA esté implicada directamente en la sintomatología del TDAH.

1.3.3. HIPÓTESIS SEROTONINÉRGICA

La 5HT (serotonina ó 5-hidroxitriptamina) es sintetizada a partir del triptófano en las neuronas serotoninérgicas. El triptófano es introducido del plasma a la neurona mediante una bomba de transporte activo de triptófano y se sintetiza la 5HT mediante las enzimas triptófano hidroxilasa (TPH) y la DOPA decarboxilasa de aminoácidos L-aromáticos (DDC). Después es almacenada en vesículas sinápticas a la espera del impulso nervioso para ser liberada.

La 5HT es degradada por la MAO y convertida en un metabolito inactivo. Además, las neuronas serotoninérgicas tienen una bomba transportadora presináptica selectiva para la 5HT (SERT), de funcionamiento análogo a los transportadores de NA y DA descritos anteriormente.

Existen cuatro grandes categorías de receptores 5HT, cada una subdividida, a su vez, en función de sus propiedades farmacológicas y moleculares. Además del transportador serotoninérgico, hay un receptor principal presináptico (5HT_{1D}) y varios receptores serotoninérgicos postsinápticos (5HT_{1A}, 5HT_{2A}, 5HT_{2C}, 5HT₃, 5HT₄...) (Stahl 2002).

Esta es la hipótesis con menor peso específico de las tres. Algunos psicotropos que intervienen en vías serotoninérgicas causan mejoría en pacientes de TDAH, pero este hecho puede justificarse por el beneficio que éstos pueden causar en enfermedades comórbidas al TDAH y no en este trastorno en sí.

1.3.4. HIPÓTESIS ALTERNATIVAS

Algunos autores defienden una posibilidad aún más compleja y posiblemente más acertada en relación a los hallazgos obtenidos, la hipótesis de múltiples neurotransmisores. Mediante esta hipótesis se intenta explicar que se produce una interacción anormal entre varios neurotransmisores. Postulan que probablemente sea la DA el neurotransmisor más involucrado, mientras que la NA, 5HT y GABA, actúen como moduladores clínicos (Himmelstein et al. 2000). Esta hipótesis explicaría la gran variabilidad existente en las manifestaciones clínicas del TDAH, pero serían necesarios más estudios que la confirmen.

Dejando los aspectos neurológicos a un lado, el TDAH se ha relacionado con la resistencia generalizada a la hormona tiroidea. El 50% de los pacientes con esta resistencia muestran síntomas compatibles con el TDAH, falta de atención e hiperactividad motora, causado por alteraciones cerebrales durante el desarrollo fetal en estos niños. De la misma forma se ha observado una mayor prevalencia en niños con desnutrición grave durante los primeros meses de vida, en niños prematuros, niños cuyas madres fumaban o ingerían alcohol durante la gestación; todo ello parece estar relacionado con un desarrollo del sistema nervioso central (SNC) incompleto, aunque pueden añadirse factores ambientales y sociales a este hecho (Faraone y Biederman 1998).

Por otra parte, la relación entre los trastornos neuropsiquiátricos autoinmunes asociados con infecciones estreptocócicas (Guilles de la Tourette y trastorno obsesivo-compulsivo) y la hiperactividad, ha promovido nuevas hipótesis que relacionan al TDAH con bases autoinmunológicas relacionadas con los estreptococos. Pero esto aún requiere más estudios para ser confirmado/desmentido, siendo de momento únicamente una hipótesis.

Una vez más, la naturaleza heterogénea del TDAH como diagnóstico psiquiátrico podría estar provocando estos resultados confusos. La falta de homogeneidad en las poblaciones de estudio ha llevado a concluir que una única causa es poco probable. El diagnóstico podría estar agrupando a múltiples trastornos cada uno con su etiología, por lo que estableciendo subgrupos podrían obtenerse fenotipos más refinados. Otra posibilidad es que una causa común subyacente (la cual no conocemos exactamente) sería capaz de exhibir diferentes manifestaciones clínicas (Tripp y Wickens 2009).

1.4. GENÉTICA DEL TDAH

Las enfermedades llamadas complejas son el producto de la combinación de diferentes factores, entre los que se encuentran tanto factores ambientales como genéticos o biológicos. Es decir, en este tipo de enfermedades, como es el caso del TDAH, la asociación de ciertas variantes genéticas con la enfermedad no es sencilla, ya que no tienen únicamente carácter

genético sino que están influidas por factores ambientales en diferente grado. En el caso concreto del TDAH está ampliamente descrito que el factor ambiental tiene gran relevancia en el desarrollo de la sintomatología (Mill y Petronis 2008; Buschgens et al. 2008; Curtis y Patel 2008).

A nivel genético, el TDAH es una enfermedad compleja poligénica, lo que quiere decir que no está originada por la variación de un único **gen**, ya que muestra lo que se conoce como efecto aditivo (se estiman de media en unos 10-30 cambios dispersos en el genoma). Se habla entonces de variante de riesgo y no de mutación causal, dicha variante de riesgo está presente tanto en personas sanas como enfermas, puesto que lo que condiciona el efecto es la combinación de los **alelos** de todas las variantes y no la presencia de una sola, diríamos entonces que el patrón de herencia se ajusta a un modelo multifactorial (Klug et al. 2008). Este modelo propone que muchos genes, comportándose cada uno de ellos de forma mendeliana, contribuyen al fenotipo de un modo acumulativo o cuantitativo. De hecho, la mayoría de personas tienen un número intermedio de las variantes de riesgo lo que no significa que padezcan dicho trastorno.

A continuación se van a describir los diferentes tipos de estudios que se han llevado a cabo para intentar dilucidar las bases genéticas del TDAH y los genes que han sido asociados.

1.4.1. ESTUDIOS FAMILIARES

Numerosos estudios familiares, de gemelos y de adopciones demuestran que los genes juegan un papel muy importante en la etiología del TDAH. Los estudios familiares evalúan el riesgo de padecer TDAH de un individuo si han sido diagnosticados otros miembros de la familia previamente (Kollins 2009). Diversos estudios de este tipo indican que existe una elevada prevalencia de TDAH entre los miembros de la familia de pacientes con este trastorno (Faraone et al. 2004, 2005). En estudios retrospectivos se encontró que el riesgo de padecer TDAH entre los padres de un niño afectado estaba incrementado de 2 a 8 veces; lo mismo se ha visto que sucede entre hermanos biológicos (Faraone y Doyle 2000). Recíprocamente, el riesgo calculado para un niño de sufrir el trastorno si uno de los padres lo padece es en torno al 40-90 % (Brookes et al. 2006a; Waldman y Gizer 2006). A este tipo de estudios familiares se les atribuye el principal problema de no ser capaces de discriminar bien entre factores ambientales y genéticos, pudiendo estar sobrevalorando la influencia genética.

Para corregir este defecto y discriminar el peso de estos factores (genéticos y ambientales) en el origen y evolución del TDAH, se han diseñado los estudios genéticos sobre gemelos. Este tipo de estudios establecen las bases de un trastorno examinando la probabilidad de un niño de padecer un trastorno si sus gemelos ya lo padecen, conocida también como tasa de concordancia (Kollins 2009). Si un trastorno es fuertemente genético por naturaleza, la tasa de concordancia para los gemelos monocigóticos será mayor en comparación con los gemelos

dicigóticos. En la Figura 6 se muestra un meta-análisis realizado con los datos de **heredabilidad** del TDAH obtenidos en veintiún estudios de gemelos realizados en Australia, Suecia, Reino Unido y Estados Unidos (Biederman et al. 2005). Este meta-análisis estima una heredabilidad media del 74% en el TDAH, lo que indica la relevancia muy importante del *background* genético en el desarrollo del trastorno. Este valor de heredabilidad es comparable al de otros trastornos psiquiátricos (Kollins 2009).

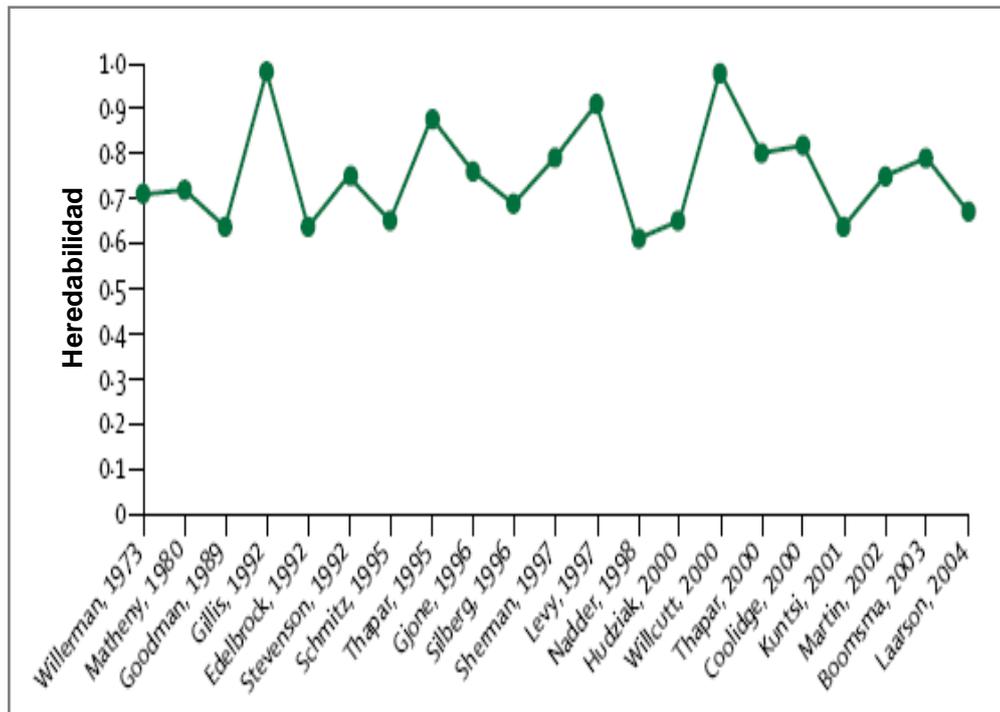


Figura 6.- Imagen obtenida de un metanálisis donde se muestran gráficamente los datos de heredabilidad obtenidos en diversos estudios genéticos sobre el TDAH realizados entre los años 1973 y 2004 en gemelos de todo el mundo. Adaptada de Biederman 2005.

Un tercer tipo de estudio corresponde a los estudios de adopciones. Estos permiten analizar el peso de factores genéticos-ambientales en la aparición de TDAH y de trastornos relacionados. Miden el riesgo genético para un trastorno comparando las tasas de dicho trastorno entre los padres biológicos y los adoptivos de niños con una condición determinada (Kollins 2009). Este tipo de estudios, a pesar de su difícil aplicación, han apoyado la implicación genética en el TDAH al reflejar que los hermanos no biológicos tienen menor riesgo de presentar el trastorno que los hermanos biológicos de un niño con TDAH.

Por último, los estudios familiares han demostrado también que gran parte de la variabilidad del rasgo hiperactividad-impulsividad dentro del TDAH, en torno al 70-90 %, se debe también a factores genéticos, pudiendo incrementarse dicha contribución cuanto más extrema sea la manifestación clínica de dicho rasgo (Herreros et al 2002).

1.4.2. ESTUDIOS DE GENÉTICA MOLECULAR

Para mejorar los conocimientos sobre el origen del TDAH, se han utilizado también los estudios de genética molecular, que incluyen algunos análisis de ligamiento a escala genómica en familias, y sobre todo estudios de asociación con genes candidatos. Además en los últimos años han tomado gran protagonismo los estudios de genoma completo ó **GWAS** (de sus siglas en inglés *Genome Wide Association Studies*). Estos últimos se han centrado en los sistemas de neurotransmisión relacionados con la fisiopatología del trastorno o con la respuesta favorable a psicofármacos.

Antes de profundizar en este tipo de estudios, sería conveniente realizar una breve descripción de los términos genéticos que más se van a mencionar en las próximas líneas:

- **Polimorfismo.**- Marcador de ADN que varía entre los diferentes individuos de una población. Para ser considerado un polimorfismo debe darse al menos en un 1% de la población; si se da en una frecuencia inferior se considera que es una mutación.
- **SNP.**- siglas del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*. Se trata de un polimorfismo de cambio de nucleótido (es un único nucleótido el que varía entre los individuos de una población), puede ser sustitución de una base por otra, una **delección** o una **inserción**. Los SNPs representan más del 90% de la variabilidad genética y son de gran utilidad en estudios evolutivos y en la investigación biomédica.
- **Haplotipo.**- Una combinación concreta de SNPs que se heredan de forma conjunta.
- **Secuencias repetidas (STR y VNTR).**- Marcadores de ADN que consisten en un número de pares de bases que se repiten en un número variable de veces entre los distintos individuos de una población. Si la repetición es de 2 ó 3 pares de bases se les llama STRs (repeticiones cortas en tándem), si la repetición abarca entre 10 y 40pb se conocen como VNTRs (repeticiones en tándem de número variable).

Los estudios de asociación miden la frecuencia de un marcador o polimorfismo dentro de una población, en contraste con los estudios de ligamiento que examinan la transmisión conjunta de un marcador y un fenotipo dentro de las familias. Con estos estudios se pretende encontrar genes candidatos o ciertas regiones del genoma que se asocien a las enfermedades complejas. El desarrollo de estos estudios se ha visto además muy favorecido por el intenso desarrollo en los últimos años de las técnicas de Biología Molecular.

Se definirá un polimorfismo como asociado con el trastorno si se encuentra en una proporción significativamente mayor en la población de pacientes que la población control.

Por otra parte un trastorno está ligado a una región de ADN (marcador), si existe mayor probabilidad de que un locus muy cercano a esa región contribuya a la expresión del trastorno. Esto implica evaluar distintos polimorfismos dentro de un gen candidato. Un gen candidato se elige, por ejemplo, porque se intuye que es biológicamente relevante en el trastorno debido a la neurobiología del mismo.

Los análisis de ligamiento son útiles cuando se trata de enfermedades que están asociadas a un único gen y que siguen un modelo de herencia mendeliana. Sobre todo se utilizan este tipo de análisis para identificar “genes mayores” causantes de enfermedades, siempre teniendo en cuenta que hay más factores y genes que modifican la acción del principal. Pero las enfermedades monogénicas no son las más habituales.

Este tipo de estudios se llevan a cabo en familias donde se hayan dado casos de la enfermedad. Se lleva a cabo mediante ensayos de tipo prueba-error, se busca cuál es el alelo de un gen que está ligado a la transmisión de la enfermedad. El gen “responsable” de la enfermedad estará en algún lugar próximo al marcador que se ha encontrado, una vez que se localiza la región cromosómica donde se ubica el gen se recurre a una base de datos genómica y se hace un estudio bibliográfico sobre cuáles de los genes de esa región podrían estar asociados a la enfermedad, por la función que desempeñan. Posteriormente se harán estudios de asociación más específicos con el gen candidato. Este tipo de estudios tienen la ventaja de no precisar de un conocimiento previo acerca de la función de los genes que participan de los mecanismos fisiopatológicos de una enfermedad y pueden servir de punto de partida para posteriores estudios de asociación. En la actualidad se tiende a sustituir los estudios de ligamiento por los estudios de asociación.

En relación a los estudios de asociación de gen candidato, cabe destacar que en este tipo de análisis no se estudian familias sino grupos poblacionales. Están en auge ya que son de gran utilidad en la búsqueda de variantes asociadas a enfermedades poligénicas y con herencia compleja. Lo que indican es una predisposición, no una relación directa alelo-enfermedad. El razonamiento es el siguiente: si un alelo está en exceso en la población de enfermos, puede predisponer a la enfermedad. Como en un grupo poblacional diverso a lo largo de “x” generaciones han ocurrido muchos más fenómenos de recombinación que en una familia, se puede encontrar la mutación causal de la enfermedad de forma más sencilla ya que la región que se acota es más pequeña que en los análisis de ligamiento. A diferencia de los estudios de ligamiento, en los de asociación suelen conocerse la estructura y funcionamiento del gen así como su regulación, localización cromosómica y la función de la proteína que codifican. Sin embargo están limitados al no conocerse los datos suficientes sobre la función o actividad de las diferentes variante polimórficas en el estudio.

Tradicionalmente se realizan estudios de un único gen o unos pocos genes candidatos pero en los últimos años se han realizado cuatro GWAS en relación al TDAH. En estos estudios se examinaron un gran número de marcadores de DNA a lo largo de la totalidad del genoma para determinar si regiones cromosómicas específicas son compartidas entre los individuos con una condición determinada (Franke et al. 2009; Jiang et al. 2006; Lasky-Su et al. 2008a). Una vez que estas regiones han sido identificadas, se analizan los genes que forman esa región en mayor profundidad y mediante su relevancia biológica en el trastorno se determinará con mayor precisión qué genes pueden estar contribuyendo al riesgo de padecer ese trastorno.

Como se va a comentar en los siguientes apartados, toda la información obtenida a través de los diversos tipos de estudios de base genética, parece indicar que en el caso del TDAH estamos ante un tipo de herencia poligénica multifactorial y por lo tanto, con influencia cuantitativa y expresión variable, dependiendo de factores ambientales diversos. Entre estos factores ambientales parecen encontrarse circunstancias perinatales, la alimentación, la educación o el estatus socioeconómico (Thapar et al. 2007). Por último, diversos autores empiezan a proponer que estamos muy cerca de conocer el origen genético del TDAH, pero que el reto se encuentra en saber manejar esa información para beneficiar a los pacientes y que estos conocimientos sean aplicables finalmente en la clínica (Thapar et al. 2007, Acosta 2007).

En los últimos 15 años ha habido un importante auge en el número de genes que se han ido asociando a la etiopatogenia del TDAH. Los principales genes que han sido asociados a un mayor riesgo de padecer TDAH o con una mejor/peor evolución de la sintomatología asociada a este trastorno pertenecen mayoritariamente a las vías de señalización de los neurotransmisores DA, NA y 5HT, aunque también se han encontrado asociaciones en genes de otros neurotransmisores, genes implicados en el metabolismo y genes de factores neurotróficos (Waldman y Gizer 2006). A continuación, en la Tabla 2, se muestran los principales genes cuyos polimorfismos se han descrito como asociados con un mayor/menor riesgo a padecer TDAH o con una evolución positiva/negativa de la enfermedad con las principales referencias bibliográficas en las que han aparecido.

Tabla 2.- Tabla resumen donde se muestran los principales genes cuyos polimorfismos se han descrito como asociados con un mayor/menor riesgo a padecer TDAH, con la presencia de comorbilidades, el subtipo o con una evolución positiva/negativa de la enfermedad, entre otros fenotipos. Los SNPs se identifican con un número rs que es único y que puede ser localizado en las distintas bases de datos existentes. En esta lista, en el caso de que aparezca sólo SNP implica que en la publicación no se indica el código rs. En la columna de la derecha se indican los principales artículos en los que se han descritos. Adaptada y actualizada de Molano-Bilbao et al. (2009).

| RECEPTORES | | | |
|---------------|--|--|--|
| GEN | FUNCION | POLIMORFISMO | REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS |
| ADRA1A | Adrenoceptor α 1A | rs17426222 rs4732682 rs573514 rs3808585 | Elia et al. 2009a; Lasky-Su et al. 2008b |
| ADRA2A | Adrenoceptor α 2A | rs1800544 rs1800545 rs553448 | Polanczyk et al. 2007; Schmitz et al. 2006; Wang et al. 2004 |
| ADRB2 | Adrenoceptor β 2 | SNP | Brookes et al. 2006a |
| AR | Receptor de andrógenos | SNP en 3' UTR | Brookes et al. 2006a; Comings et al. 2000a, 2000b; Feng et al. 1998 |
| CHRNA4 | Receptor nicotínico de acetilcolina subunidad α 4 | SNP exón 2 y 5 rs2273505 | Brookes et al. 2006a |
| CNR1 | Receptor cannabinoide CB1 | SNP | Franke et al. 2009; Onaivi 2009; Ponce et al. 2003 |
| DRD1 | Receptor D1 de dopamina | haplotipo D1P.5 rs245981 rs686 rs4532 rs484 | Luca et al. 2007 |
| DRD4 | Receptor D4 de dopamina | rs747302 rs1800955 ins 120bp VNTR (2-11R de 48bp) | Banaschewski et al. 2010; Barr et al. 2001a; Bellgrove et al. 2005; Brookes et al. 2006a; DeYoung et al. 2006; Ding et al. 2002; Elia y Devoto 2007; Faraone et al. 2001; Grady et al. 2005; Hamaman et al. 2004; Horner et al. 2007; Kereszturi et al. 2006, 2007; Kirley et al. 2004; Lowe et al. 2004b; Rowe et al. 1998; Seaman et al. 1999; Shaw et al. 2007b; Szantai et al. 2005; Todd et al. 2005; Yang et al. 2008 |
| DRD5 | Receptor D5 de dopamina | Repetición CA (148pb) | Hawi et al. 2003, 2005; Lowe et al. 2004a; Mill et al. 2004a |
| GRIK1 | Receptor ionotrópico de glutamato GluK1 | rs363512 | Lasky-Su et al. 2008b |
| GRIN2A | Receptor ionotrópico de glutamato GluN2A | SNP | Adams et al. 2004; Smalley et al. 2002; Turic et al. 2004 |
| GRIN2B | Receptor ionotrópico de glutamato GluN2B | SNP SNP intrón 3 | Brookes et al. 2006a; Dorval et al. 2007 |
| HTR1B | Receptor 1B de serotonina | rs4294 | Amin et al. 2009; Banaschewski et al. 2010; Comings et al. 2000a; Elia y Devoto 2007; Forero et al. 2009; Gizer et al. 2009; Ickowicz et al. 2007; Mill et al. 2005; Smoller et al. 2006; Zeni et al. 2007 |
| HTR2A | Receptor 2A de serotonina | rs4313 rs6561333 rs7984966 rs7322347 rs7997012 rs4311 rs4314 | Banaschewski et al. 2010; Elia et al. 2009a; Lasky-Su et al. 2008a, 2008b; Levitan et al. 2002; Li et al. 2006; Oades et al. 2008; Quist et al. 2000; Ribases et al. 2009b; Zeni et al. 2007 |
| ITPR2 | Receptor I3P tipo 2 | rs3782309 | Lasky-Su et al. 2008b; Neale et al. 2008a, 2008b |
| RORA | Receptor A retinoideo | rs922781 | Lasky-Su et al. 2008b; Neale et al. 2008a, 2008b |

| TRANSPORTADORES | | | |
|--------------------|--|---|--|
| GEN | FUNCIÓN | POLIMORFISMO | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS |
| ATP2C2 | ATPasa 2C2 de Ca ⁺² | rs10514604 | Lesch et al. 2008; Zhou et al. 2008a, 2008b |
| DAT1/SLC6A3 | Transportador de dopamina | VNTR (40 bp) rs4347 rs40184 rs1042098 rs27072 rs11544774 rs3843145 rs2452511 rs10070282 rs2550944 rs11544750 rs463379 rs2975226 rs28364997 rs5549 | Althaus et al. 2010; Banaschewski et al. 2010; Barr et al. 2001b; Bobb et al. 2005; Brookes et al. 2006a, 2006b, 2008b; Carrasco et al. 2004; Cheon et al. 2005; Daly et al. 1999; Durston et al. 2009; Elia y Devoto 2007; Feng et al. 2005b; Friedel et al. 2007; Gadow et al. 2009; Gizer et al. 2009; Hawi et al. 2003, 2005; Langley et al. 2005; Laucht et al. 2007; Mill et al. 2005; Ouellet-Morin et al. 2008; Paloyelis et al. 2010; Wang et al. 2008; Xu et al. 2005, 2009; Zeni et al. 2007; Zhou et al. 2008a |
| KCNC1 | Canal voltaje dependiente de K ⁺ | rs3893215 | Banaschewski et al. 2010; Lesch et al. 2008 |
| KCNIP1 | Proteína 1 moduladora de canal de K ⁺ | rs1541665 | Banaschewski et al. 2010; Lasky-Su et al. 2008b; Neale et al. 2008a, 2008b |
| KCNIP4 | Proteína 4 moduladora de canal de K ⁺ | rs876477 | Banaschewski et al. 2010; Lasky-Su et al. 2008b; Neale et al. 2008a, 2008b |
| SLC1A1 | Transportador de glutamato, alta afinidad neuronal/epitelial | rs10974610 | Sonuga-Barke et al. 2008 |
| SLC6A2 | Transportador de noradrenalina | rs28386840 rs998424 rs2242447 rs3785157 rs3785143 rs11548324 | Banaschewski et al. 2010; Biedeman et al. 2008; Forero et al. 2009; Joung et al. 2010; Kim et al. 2006; Kooij et al. 2007; Lasky-Su et al. 2008b; Ramoz et al. 2009; Retz et al. 2007; Xu et al. 2005; Yang et al. 2004 |
| SLC1A3 | Transportador de glutamato | rs2249272 rs3774581 rs2032893 | Elia et al. 2009b; Turic et al. 2005 |
| SLC6A4 | Transportador de serotonina | Inserción 44 pb rs2066713 | Banaschewski et al. 2010; Biedeman et al. 2008; Curran et al. 2005; Elia y Devoto 2007; Forero et al. 2009; Kent et al. 2002; McGough et al. 2009; Mick et al. 2009; Seneviratne et al. 2009; Tharoor et al. 2007; Wigg et al. 2006 |
| SLC9A9 | Intercambiador Na ⁺ /H ₂ | rs13057533 | Lasky-Su et al. 2008b |
| SLCO3A1 | Transportador de aniones inorgánicos | rs7495052 | Lasky-Su et al. 2008b |

| GENES IMPLICADOS EN EL METABOLISMO | | | |
|------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|---|
| GEN | FUNCIÓN | POLIMORFISMO | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS |
| CES1 | Carboxil esterasa 1 | rs71647871 | Nemoda et al. 2009; Zhu et al. 2008 |
| COMT | catecol-O-metiltransferasa | rs4480 rs6269 rs4633 rs4818 | DeYoung et al. 2010; Gadow et al. 2009; Palmason et al. 2010; Paloyelis et al. 2010; Retz et al. 2007 |
| DBH | Dopamina β hidroxilasa | rs2519152 rs1411115 | Elia y Devoto 2007; Kirley et al. 2002; Tang et al. 2006 |

| GENES IMPLICADOS EN EL METABOLISMO | | | |
|------------------------------------|--------------------------------------|---|---|
| GEN | FUNCION | POLIMORFISMO | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS |
| DDC | Dopa decarboxilasa | rs11238131 rs6592961 rs1982406 rs2044859 rs11575454 microsatélite 213 pb | Banaschewski et al. 2010; Dasbanerjee et al. 2008; Guan et al. 2008; Hawi et al. 2001; Lasky-Su et al. 2008b; Ribases et al. 2007, 2009b |
| FADS1 | Desaturasa 1 de ácidos grasos | rs174548 | Ribases et al. 2008 |
| FADS2 | Desaturasa 2 de ácidos grasos | rs174411 rs498793 | Brookes et al. 2006a |
| MAOA | Monoaminoxidasa A | VNTR(30 bp) STR (CA, 110-124 bp) rs3027399 SNP exón 8 | Biedeman et al. 2008; Brookes et al. 2006a; Cases et al. 1998; Das et al. 2006; Domschke et al. 2005; Gizer et al. 2009; Guan et al. 2008; Jiang et al. 2001, 2006; Lawson et al. 2003; Payton et al. 2001; Vitalis et al. 1998 |
| MAOB | Monoaminoxidasa B | rs1799836 rs1799836 rs307415 rs5906213 | Jiang et al. 2001; Li et al. 2007; Ribases et al. 2007, 2009b |
| NOS1 | Óxido nítrico sintasa neuronal | rs478597 | Lasky-Su et al. 2008b; Reif 2010 |
| PNMT | Feniletanolamina N-metil-transferasa | SNP exón 8 | Brookes et al. 2006a |
| SULF2 | Sulfatasa 2 | rs4810685 | Lasky-Su et al. 2008b |
| STS | Sulfatasa esteroidea microsomal | rs2770112 rs12861247 | Brookes et al. 2008a; Davies et al. 2007, 2009; Doherty et al. 2003; Kent et al. 2008 |
| TPH2 | Triptófano hidroxilasa | rs1843809 rs1384493 rs1384497 | Banaschewski et al. 2010; Brookes et al. 2006a; Gizer et al. 2009; Lasky-Su et al. 2008b; Sheehan et al. 2005; Walitza et al. 2005 |

| FACTORES NEUROTRÓFICOS | | | |
|------------------------|--|--|--|
| GEN | FUNCION | POLIMORFISMO | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS |
| BDNF | Factor neurotrófico derivado de cerebro | rs4245 | Banaschewski et al. 2010; Conner et al. 2008; Forero et al. 2009; Gadow et al. 2009; Kent et al. 2005; Lasky-Su et al. 2008b; Mick et al. 2009; Ramos-Quiroga et al. 2007; Ribases et al. 2008 |
| CNTFR | Receptor neurotrófico | rs1124882 rs1080750 rs7036351 | Ribases et al. 2008 |
| NEDD6L | Precursor neural | rs4149601 | Amin et al. 2009 |
| NGF | Factor de crecimiento nervioso | rs4330 | Banaschewski et al. 2010; Ribases et al. 2008; Syed et al. 2007 |
| NTF3 | Neurotrofina 3 | rs4074967 rs6489630 rs7956189 rs6332 | Conner et al. 2008; Ribases et al. 2008; Syed et al. 2007 |
| NTRK2 | Receptor neurotrófico tirosín kinasa | rs7816 rs11795386 rs1387926 rs1586681 | Conner et al. 2008; Dasbanerjee et al. 2008; Ribases et al. 2008 |
| NEUROD6 | Implicado en la diferenciación neurogénica | Sólo se menciona el gen | Ribases et al. 2009b; Shaw et al. 2009 |

| OTRAS FUNCIONES | | | |
|-----------------|--|--------------------------------------|---|
| GEN | FUNCIÓN | POLIMORFISMO | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS |
| ADAMTS2 | Actividad desintegrina y metaloproteinasas | rs9687070 rs3776816 rs10039254 | Lasky-Su et al. 2008b |
| ARRB2 | β arrestina 2 | rs7208257 SNP exón 11 | Brookes et al. 2006a; Dasbanerjee et al. 2008; Lasky-Su et al. 2008b |
| ASTN2 | Astrotactina 2 | rs10983238 | Banaschewski et al. 2010; Lesch et al. 2008 |
| CDH13 | Cadherina 13 | rs6565113 rs7187223 rs11646411 | Banaschewski et al. 2010; Franke et al. 2009; Lasky-Su et al. 2008b; Lesch et al. 2008; Neale et al. 2008b; Zhou et al. 2008b |
| CDH23 | Cadherina 23 | rs11594082 | Banaschewski et al. 2010; Lesch et al. 2008 |
| CLOCK | Relacionado con los ritmos circadianos | rs1801260 rs1801240 | Kissling et al. 2007 |
| CREB5 | Proteína unión AMPc | rs2237349 | Lesch et al. 2008 |
| CTNNA2 | Catenina α 2 | rs13395022 | Lesch et al. 2008; Neale et al. 2008b |
| DMRT2 | Factor de transcripción | rs17641078 | Lasky-Su et al. 2008b |
| DNM1 | Dinamina 1 | rs2502731 | Lesch et al. 2008 |
| EREG | Epiregulina | rs1350666 | Lasky-Su et al. 2008b |
| GPC4 | Heparan sulfato proteoglicano de membrana | rs7995215 | Lesch et al. 2008 |
| HES1 | Proteína represora de la transcripción | SNP | Brookes et al. 2006b |
| HH3R | Receptor de histamina H3 | - | Horner et al. 2007; Liu et al. 2008 |
| IL16 | Interleukina 16 | rs7172689 rs4128767 | Lasky-Su et al. 2008b |
| IMMP2L | Complejo peptidasa de la membrana interna mitocondrial | rs4948385 | Elia et al. 2009; Franke et al. 2009; Lasky-Su et al. 2008a |
| ITGA11 | Integrina α 11 | rs7164335 | Banaschewski et al. 2010; Lesch et al. 2008 |
| ITGAE | Integrina α E | rs220470 | Banaschewski et al. 2010; Lesch et al. 2008 |
| LPHN3 | Latrofilina 3 | - | Arcos-Burgos et al. 2010 |
| MAP1B | Proteína asociada a microtúbulo | rs2199161 | Lesch et al. 2008; Zhou et al. 2008b |
| MOBP | Proteína oligodendrocitaria | rs864643 | Lesch et al. 2008 |
| MYT1L | Similar a factor de transcripción 1 mielínico | rs2241685 | Franke et al. 2009; Kim et al. 1997; Lesch et al. 2008; Riley et al. 2010; Vierbuchen et al. 2010; Vrijenhoek et al. 2008 |
| NAV2 | Navegador neuronal 2 | rs874426 | Lasky-Su et al. 2008b; Neale et al. 2008b |
| NRG3 | Neurregulina 3 | rs17746658 | Sonuga-Barke et al. 2008 |
| NUCB1 | Nucleobindina 1 | rs9676447 | Lasky-Su et al. 2008b; Neale et al. 2008b |
| RAB27B | Miembro RAS de familia de oncogenes | rs2311120 | Amin et al. 2009a; Neale et al. 2008b |

| OTRAS FUNCIONES | | | |
|-----------------|---|---|--|
| GEN | FUNCIÓN | POLIMORFISMO | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS |
| SH3BGR2 | Dominio de unión rico en ác.glutámico | rs 1062793 rs 17673653 | Lasky-Su et al. 2008b; Neale y Faraone 2008a; Neale et al. 2008; Ogdie et al. 2003 |
| SNAP25 | Proteína 25 asociada al sinaptosoma | rs3744544 rs 1051312 rs4077490 rs343004 rs343020 rs342547 rs3787283 microsatélite (ATTT) | Banaschewski et al. 2010; Barr et al. 2000; Bobb et al. 2005; Brophy et al. 2002; Carroll et al. 2009; Elia y Devoto 2007; Feng et al. 2005a; Forero et al. 2009; Gizer et al. 2009; Guan et al. 2008; Hess et al. 1992; Kim et al. 2007; Kustanovich et al. 2003; Lasky-Su et al. 2008b; Mill et al. 2002, 2004b, 2005; Muller et al. 2005a; Sollner et al. 1993; Xu et al. 2005; Young et al. 1998 |
| SUPT3H | Proteína iniciadora de la transcripción | rs3799977 | Lesch et al. 2008; Zhou et al. 2008b |
| SYP | Sinaptosina | rs5904754 | Brookes et al. 2006b |
| SYT1 | Sinaptotagmina 1 | rs2272500 rs2251214 rs3849228 rs 1245779 rs 17293059 rs 1732664 rs 10861941 rs 1245820 rs 17005561 rs 1245769 rs 11114112 rs 11834669 rs 7963801 rs 6539445 rs 1526950 rs 12827411 rs 1245775 | Dasbanerjee et al. 2008; Lasky-Su et al. 2008b |
| TLL2 | Proteína 2 similar a toloide | rs 10786284 | Lasky-Su et al. 2008b; Lesch et al. 2008; Neale et al. 2008b |

1.4.2.1. GENES CATECOLAMINÉRGICOS

Para seleccionar los principales genes sobre los que realizar los estudios genéticos, se han utilizado los conocimientos de la fisiopatología y de la etiología del TDAH. De entre todas las hipótesis descritas para explicar el origen del TDAH, la más aceptada en la actualidad es la hipótesis de la disfunción dopaminérgica como causante de los síntomas propios del TDAH, como se ha mencionado anteriormente. Por tanto, la principal vía que se ha utilizado en los estudios genéticos ha sido la vía de las catecolaminas en toda su extensión (síntesis-transporte-metabolismo) siendo los genes relacionados con esta vía los más estudiados (Arnsten 2004).

1.4.2.1.1. SÍNTESIS DE CATECOLAMINAS

- **TIROSINA HIDROXILASA (TH)**

La tirosina hidroxilasa (TH) es la enzima que cataliza la conversión de tirosina a dopa, el primer paso en la síntesis de catecolaminas y es la enzima limitante en la síntesis de la DA y de la NA. Hasta la fecha se han llevado a cabo cuatro estudios de asociación entre distintos polimorfismos del TH y el TDAH pero ninguno de ellos ha obtenido ninguna asociación significativa (Barr et al. 2001b; Comings et al. 1995; Kirley et al. 2002; Payton et al. 2001). Se ha sugerido un efecto de impronta genómica paterna en la herencia de este gen ya que se encuentra cercano a ciertos genes que se improntan, por lo que sería necesario replicar estos estudios de asociación teniendo en cuenta este fenómeno, aunque el nivel de asociación que se espera sea bajo debido a los estudios previos.

- **DOPA DECARBOXILASA (DDC)**

La enzima dopa decarboxilasa (DDC) cataliza tanto la conversión de dopa a DA como la de L-5-hidroxitriptófano a 5HT. Como se ha comentado en el apartado de neurobiología, ambas vías se han propuesto como causantes de la sintomatología del TDAH, por lo que la DDC es un candidato muy atractivo de asociación con el TDAH. Hawi y colaboradores llevaron a cabo el único estudio específico de asociación entre TDAH y DDC publicado (Hawi et al. 2001). Encontraron que en pacientes diagnosticados con TDAH, existía una mayor transmisión del alelo de 213 pb de un marcador microsatélite (D7S2422) localizado en el extremo 3' del gen (inserción/delección de 4 pb). Esta asociación parecía mayor cuando se estudiaban únicamente las transmisiones de origen paterno ($p=0,1$, **riesgo relativo**=1,44). Brookes y colaboradores, en su análisis de 51 genes (Brookes et al. 2006a) describen también la asociación del SNP con código rs11575454 localizado en el **intrón 8** del gen y que parece no estar en desequilibrio de ligamiento con la inserción anteriormente descrita. Esta asociación se halló también en un trabajo publicado en el año 2007 por Ribases y colaboradores (Ribases et al. 2007). Posteriormente otros estudios (Banaschewski et al. 2010) han encontrado asociación entre otros polimorfismos del gen y el TDAH.

Por lo que, y aunque estos estudios requieran ser replicados en poblaciones independientes para confirmar las asociaciones, el gen DDC parece ser de gran interés por su relación con el TDAH.

- **DOPAMINA β HIDROXILASA (DBH)**

La enzima dopamina β hidroxilasa (DBH) es responsable de la conversión de DA en NA por lo que resulta un gen de interés para estudios de asociación y ligamiento en relación al TDAH. El primer estudio realizado encontró una asociación entre el alelo A2 del polimorfismo *TaqI* localizado en el intrón 5 (Daly et al. 1999), confirmándose posteriormente en otro estudio esta asociación (Roman et al. 2002). Por otro lado, se observó que existía una asociación del TDAH

con el alelo A1 de este polimorfismo (Wigg et al. 2002) aunque no pudo ser confirmado por otro estudio un año después y en el que no se encontró una asociación significativa en este polimorfismo (Smith et al. 2003). Recientemente, se ha confirmado que podría existir asociación de este polimorfismo con el TDAH, aunque ésta es pequeña y confiere un riesgo relativo pequeño (Elia y Devoto 2007).

1.4.2.1.2. SISTEMA DOPAMINÉRGICO

Como se ha comentado anteriormente, anomalías en el sistema de neurotransmisión de la DA se han hipotetizado como subyacentes al TDAH desde hace más de 15 años (Lewy 1991). Los genes que codifican para los receptores dopaminérgicos han sido identificados como candidatos a estudio genético (Waldman et al. 2004).

• RECEPTOR DE DOPAMINA D4 (DRD4)

El interés inicial en el receptor DRD4 apareció en estudios de asociación con el comportamiento de búsqueda de nuevas emociones (“*novelty seeking*”) (Ebstein et al. 1996; Benjamin et al. 1996). Este tipo de comportamiento se ha asociado con los altos niveles de impulsividad y excitabilidad característicos del TDAH (Faraone et al. 1999) y se ha confirmado posteriormente en estudios de ratones *knockout* para este gen (Rubinstein et al. 1997).

Numerosos estudios han investigado la asociación entre el TDAH y el alelo de 7 repeticiones de 48 pb de una VNTR presente en el **exón 3** (Mill et al. 2002b; Roman et al. 2001). Esta asociación es uno de los hallazgos que más veces se han replicado en el área de la Genética psiquiátrica (Stein y McGough 2008).

En el análisis realizado sobre 51 genes (Brookes et al. 2006b) también se detectó una mayor transmisión de este alelo de padres **heterocigotos** a la descendencia afectada por TDAH (test de alelos $p > 0,09$); esto es consistente con una pequeña pero significativa asociación genética. Biológicamente, el receptor que se sintetiza a partir de la variante del gen con 7 repeticiones tiene una funcionalidad distinta al que se forma a partir de los alelos con 2 y 4 repeticiones, incluso hay estudios que relacionan a este polimorfismo con una corteza cerebral más delgada (Shaw et al. 2007b).

En diferentes estudios independientes, también se han asociado a un mayor riesgo de padecer TDAH ciertos polimorfismos de cambio de nucleótido del gen del DRD4, incluyendo el alelo A del SNP con código rs1800955 (Bellgrove et al. 2005; Lowe et al. 2004b) y una asociación más débil con el alelo C del SNP con código rs747302. Ambos polimorfismos están localizados en la región promotora del gen.

Al mismo tiempo, en estudios recientes (Kereszturi et al. 2007) se ha definido al alelo de una inserción de 120 pb localizada a 1.2 kb hacia el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción como alelo de riesgo para TDAH describiéndose también el efecto de esta duplicación sobre la eficacia de la transcripción génica.

En la actualidad se continúan realizando numerosos estudios, tanto genéticos, como funcionales y anatómicos para dilucidar si existe implicación de las asociaciones descritas previamente a nivel fenotípico, y buscar nuevas asociaciones (Banaschewski et al. 2010).

- **RECEPTORES DE DOPAMINA D1 Y D5 (DRD1 Y DRD5)**

Los receptores DRD1 y DRD5 de DA pertenecen a una clase de receptores distinta a la del DRD4. Tienen únicamente un exón y estimulan la actividad adenilciclase (Sunahara et al. 1991). El polimorfismo más ampliamente estudiado del gen que codifica para DRD5 es una repetición de dos nucleótidos (CA) localizada aproximadamente a 18,5 kb del sitio de inicio de la transcripción (Hawi et al. 2003). Existe gran variabilidad en los resultados de los estudios de asociación de este polimorfismo, sin embargo, un meta-análisis de estudios familiares (Maher et al. 2002) reveló una asociación significativa entre el receptor DRD5 (el alelo de riesgo de 148pb) y el TDAH, lo que podría sugerir que resultados de asociación previos que fueron negativos pudieran ser debidos a una inadecuada potencia estadística. Además los estudios más recientes (Lowe et al. 2004a; Hawi et al. 2003) confirman esta asociación.

El interés por el receptor DRD1 y su posible asociación con el TDAH, por el contrario, es muy reciente. Los primeros estudios de ratones *knockout* para DRD1 que mostraban comportamiento locomotor hiperactivo se realizaron en 1994 (Xu et al. 1994). Se trata de un candidato muy atractivo, ya que los receptores de tipo D1 se encuentran presentes en el córtex prefrontal y en el estriado, dos regiones cerebrales que se han descrito por su implicación en el TDAH (Arnsten et al. 2004; Levey et al. 1993). Además, se ha demostrado el papel de los receptores tipo D1 en los procesos de memoria que se localizan en el córtex prefrontal (Castellanos y Tannock 2002). En base a todo esto, Misener y colaboradores (Misener et al. 2004), llevaron cabo el primer estudio de asociación entre DRD1 y TDAH, encontrando una asociación entre un haplotipo que parecía estar más fuertemente asociado al subtipo inatento que a los síntomas hiperactivos-impulsivos. Aunque es necesario realizar más estudios, esta asociación con el gen del receptor DRD1 parece prometedora.

Los estudios realizados hasta la fecha para los receptores de dopamina D2 y D3 (DRD2 y DRD3), no han mostrado una asociación estadísticamente significativa entre ningún polimorfismo de estos genes y un mayor riesgo de padecer TDAH.

- **TRANSPORTADOR DE DOPAMINA (DAT1)**

El transportador de DA (DAT1/SLC6A3) es una proteína del tipo transportadora de solutos (*solute carrier*) que es responsable de la recaptación de DA de la hendidura sináptica hacia la neurona presináptica. Se encuentra densamente distribuido en el estriado y en el núcleo accumbens y representa el principal mecanismo de regulación de la DA en estas regiones cerebrales (Ciliax et al. 1999). Hay muchas razones que justifican al DAT1 como gen candidato para el TDAH. La primera es que los tratamientos de tipo estimulante como el metilfenidato (uno de los tratamientos más ampliamente prescritos para este trastorno y entre los más eficaces), actúan inhibiendo este transportador de DA, con lo que se incrementa la disponibilidad de DA en la hendidura sináptica (Spencer et al. 2000). En segundo lugar, en ratones *knockout* que no poseen la proteína DAT1, se producen síntomas que recuerdan al TDAH como son la hiperactividad o la deficiencias en el comportamiento inhibitorio. En estos ratones, el tratamiento con estimulantes reduce los síntomas de la hiperactividad (Gainetdinov et al. 1999; Zhuang et al. 2001). Por estas razones el transportador DAT1 parece ser un fuerte candidato para estudios de asociación y ligamiento de TDAH. Sin embargo los resultados que se han obtenido muestran una gran controversia.

Cook y colaboradores (Cook et al. 1995) encontraron por primera vez una asociación estadísticamente significativa entre el DAT1 y el TDAH al realizar con 58 niños un estudio de asociación entre una VNTR de 40 pb (localizada en la región 3'UTR) y el riesgo de padecer TDAH. Los alelos más comunes de este polimorfismo son el de 10 repeticiones (480 pb) y el de 9 repeticiones (440 pb). Posteriormente se han realizado numerosos ensayos de este tipo para buscar la posible asociación de estos polimorfismos con el TDAH. Los resultados muestran una gran disparidad en cuanto a cuál de los dos polimorfismos tiene una mayor asociación, e incluso hay estudios que no encuentran diferencias entre ambos. Dos meta-análisis (Todd et al. 2001; Van der Meulen et al. 2005) concluyeron una pequeña asociación pero no significativa (OR de 1.14 y 1.27 respectivamente) entre el alelo 10R y TDAH. Además, otros estudios (Carrasco et al. 2004; Langley et al. 2005; Muglia et al. 2002) no encontraron diferencias significativas en el alelo 10R entre los casos y los controles, por lo que esta relación con el diagnóstico de TDAH es dudosa. Un estudio más reciente (Brookes et al. 2006b) encontró asociación entre el haplotipo formado por la variante 10R y una VNTR de 3R en el intrón 8, en una muestra taiwanesa e inglesa ($p < 0,04$). Sin embargo, otros autores comparando la severidad de los síntomas en lugar de fijarse en la presencia o ausencia de TDAH, muestran que parece existir una relación entre la severidad y el alelo 10R de 480pb (Muglia et al. 2002, Mill et al. 2005). Al mismo tiempo, hay estudios que niegan esta asociación (Wang et al. 2008). Sería necesario replicar los resultados con poblaciones de mayor tamaño y/o de diferente origen étnico ya que los resultados que se han obtenido son contradictorios (Banaschewski et al. 2010). Un estudio reciente muy interesante en una población de 65 niños de entre 10 y 13 años se encontró una asociación positiva entre la combinación de alelos 10R/10R y una mejor respuesta cognitiva (Althaus et al. 2010).

También se han estudiado numerosos SNPs en este gen, como son el polimorfismo con código rs4347 en el exón 9, el polimorfismo con código rs11544774 en el exón 15 y los polimorfismos con códigos rs40184, rs1042098 y rs27072 en la región 3'UTR (Brookes et al. 2006a, Hawi et al. 2003). Por último Brookes y colaboradores (Brookes et al. 2006b) describieron también asociaciones entre ciertos polimorfismos en la región 5'flanqueante y que mostraban una fuerte asociación (los polimorfismos con código rs2452511, rs10070282, rs2550944) o el polimorfismo con código rs11544750 que mostraba una asociación un poco más débil. Estos resultados positivos nos indican que sería de gran interés realizar otro tipo de estudios que prueben nuevas variantes polimórficas de DAT1 (sobre todo si se conoce que afectan a la funcionalidad del gen) además de estudiar la clásica VNTR.

1.4.2.1.3. SISTEMA NORADRENÉRGICO

Dada la hipótesis postulada por Pliszka y colaboradores (1996) de que una disfunción noradrenérgica y/o adrenérgica podría ser causante de TDAH además de haberse sugerido que las neuronas adrenérgicas influyen en los procesos de atención y funciones ejecutoras a través de la inhibición de neuronas noradrenérgicas (Halperin et al. 1997), los investigadores comenzaron a examinar el potencial papel en el desarrollo del TDAH de los receptores adrenérgicos (ADRA) y del transportador noradrenérgico (NET1).

• ADRENOCEPTORES (ADRA1A, 2A, 1C, 2C Y ADRB2)

Los adrenoceptores que más se han estudiado por su posible relación con el TDAH han sido tradicionalmente los receptores ADRA2A, 2C y 1C. Sin embargo, los receptores ADRB2 y ADRA1A son recientes descubrimientos como genes candidatos de asociación con el TDAH (Brookes 2006a; Lasky-Su et al. 2008b).

Un GWAS realizado con familias con TDAH encontró una asociación significativa entre todos los síntomas de la enfermedad estudiados (síntomas impulsivos-hiperactivos y síntomas de falta de atención) y varios SNPs en el gen ADRA1A (Lasky-Su et al. 2008b). En otro estudio reciente con 270 familias afectadas de TDAH, se analizaron 557 SNPs en 27 genes candidatos y la señal de asociación más intensa correspondió al SNP rs3808585 en el gen ADRA1A (Elia et al. 2009a), por lo que los resultados obtenidos con este gen son prometedores.

El ADRA2A tiene un SNP en la región promotora (-1291 C/G) (Comings et al. 1999) y que se ha examinado tanto en estudios de caso-control como en familiares. Se concluyó que el alelo G estaba asociado con el TDAH y el trastorno oposicionista desafiante o síntomas de trastorno de conducta, mientras que el alelo C se asoció con un conjunto de otros trastornos como el obsesivo-compulsivo, síntomas esquizoideos y afectivos, adicciones y ataques de pánico (Comings et al. 2003). Dos estudios familiares no encontraron asociación con el diagnóstico de TDAH (Roman et al. 2003; Xu et al. 2001), pero el llevado a cabo por Román y colaboradores

encontró una asociación significativa del alelo G con las elevadas puntuaciones de los síntomas inatentos y combinados (Roman et al. 2003).

En relación con el ADRA2C se ha estudiado tanto en análisis de caso-control como en familiares, una repetición de dos nucleótidos localizada a aproximadamente 4 kb del inicio del gen y un SNP del ADRA1C que conlleva cambio de aminoácido (C492T, Cys > Arg), pero no se han encontrado asociaciones significativas importantes entre estos dos genes y un mayor riesgo de padecer TDAH (Barr et al. 2002; Comings et al. 1999; De et al. 2004). Sin embargo, sería interesante realizar nuevos estudios de asociación de estos genes utilizando marcadores adicionales y tamaños muestrales mayores, para poder descartarlos como posibles candidatos de asociación con la enfermedad.

- **TRANSPORTADOR DE NORADRENALINA (SLC6A2/NET1)**

El transportador de NA, al igual que el de DA es una proteína transportadora de soluto responsable de la recaptación de noradrenalina en la hendidura sináptica y de introducirla de nuevo a la neurona presináptica. Se encuentra expresado de manera importante en los lóbulos frontales y es un mecanismo de regulación de la actividad noradrenérgica en el córtex prefrontal (Stahl 2002). Este transportador se ha estudiado debido a que los fármacos que lo bloquean (antidepresivos tricíclicos y atomoxetina) son eficaces en el tratamiento del TDAH (Biederman y Spencer 2000, Spencer et al. 2002).

Los primeros estudios que buscaron asociaciones lo hicieron entre polimorfismos localizados hacia el extremo 3' del gen (exón 9 e intrones 7, 9 y 15) y el TDAH no las encontraron (McEvoy et al. 2002). Sin embargo, en estudios posteriores se identificaron ciertos SNPs que presentaban cierta asociación (Bobb et al. 2005, Xu et al. 2005). Analizando 12 genes en 143 pacientes de TDAH, en 192 padres y en 129 controles sanos, se halló que tres SNPs (rs998424, rs2242447 y rs3785157) se encontraban asociados con el TDAH ($p < 0,009$) (Bobb et al. 2005). Por el contrario, no se encontró asociación en otra muestra distinta ni para el SNP rs2242447 ni para un marcador cercano del SNP rs3785157, el SNP rs1841447. Pero se encontró que SNPs localizados entre el primer intrón (rs3785143) y el quinto intrón (rs11548324) estaban asociados a TDAH (Brookes et al. 2006a). En un estudio posterior de asociación entre polimorfismos de cambio de nucleótido de NET1 y TDAH (Kim et al. 2007), se confirma la asociación entre los SNPs rs3785143 y rs11548324, siendo la primera vez que se replicaron los resultados positivos de asociación de NET1. Hasta la fecha, son numerosos los estudios que se han centrado en este gen debido a su importancia biológica y a los buenos resultados obtenidos previamente (Ramos et al. 2009, Jung et al. 2010).

En el año 2009 se realizó con éxito el primer estudio funcional con 4 variantes de la proteína SLC6A2 (4SNPs). Encontraron que 3 de las variantes, T283M, V245I y T283R, mostraban transporte de sustrato reducido (Hahn et al. 2009). Sería necesario replicar este tipo de resultados pero parece que existe una correlación entre ciertos SNPs del gen NET1 y la funcionalidad del transportador de NA.

1.4.2.1.4. METABOLISMO DE CATECOLAMINAS

- **CATECOL-O-METILTRANSFERASA (COMT)**

La enzima COMT es la responsable de la degradación de catecolaminas (DA y NA) y por lo tanto regula también su disponibilidad en la hendidura sináptica. Se expresa de manera importante en los lóbulos frontales y juega un papel importante regulando los niveles de dopamina en esta región (Hong et al. 1998), ya que aquí se expresa poco el transportador de dopamina DAT1 (Ciliax et al. 1999).

Su implicación en el TDAH se ha estudiado recientemente, aunque los resultados no son esclarecedores. Varios estudios familiares han mostrado una asociación no significativa entre el SNP localizado en el exón 4 que implica cambio de aminoácido de valina (Val) a metionina (Met) y se ha visto que aquellos individuos **homocigotos** para Val tienen una actividad enzimática 3-4 veces superior a aquéllos homocigotos para Met. Por este hecho, sería razonable pensar el alelo Val como alelo de riesgo de TDAH (Payton et al. 2001, Barr et al. 1999). También se ha descrito una posible asociación entre la variante Val y el subtipo impulsivo-hiperactivo (Eisenberg et al. 1999) y con otros trastornos psiquiátricos como el trastorno bipolar.

Sin embargo existen otros trabajos que indican que no existen asociaciones significativas (Eisenberg et al. 1999, Qian et al. 2003). En este último estudio se encontró que no había asociación entre el alelo Val y el TDAH cuando se realizó el análisis únicamente con chicos pero que se encontraba sobre-representado cuando analizaban solamente a las niñas. Este estudio sugiere que existe una gran diferencia sexual en el comportamiento de COMT y el TDAH, lo que podría explicar algunos de los resultados de asociación negativos mencionados anteriormente. Como conclusión, se requiere realizar un mayor número de análisis de asociación entre COMT y el TDAH, pero identificando el sexo como una posible variable modificadora (Waldman y Gizer 2006). Otro estudio posterior de asociación de este gen que se centró en otros dos SNP con códigos rs4480 y rs4818, no encontró que ninguna de las variantes esté especialmente asociada con el TDAH pero que podrían tener cierta relación con el grado de severidad de los síntomas (Retz et al. 2007).

Recientemente ha habido un aumento importante en el número de estudios que se han centrado en el análisis de la posible asociación de COMT y el TDAH, y los resultados han sido muy positivos ya que se replican las asociaciones constantemente. Por ello, COMT parece un gen de gran relevancia en relación a la sintomatología y manifestaciones fenotípicas características del TDAH (DeYoung et al. 2010; Gadow et al. 2009; Palmason et al. 2010; Paloyelis et al. 2010).

- **MONOAMINOXIDASAS A Y B (MAOA y MAOB)**

Los genes de la monoaminoxidasa (MAO) están localizados en regiones próximas del cromosoma X y codifican enzimas implicadas en el metabolismo de la DA, 5HT y NA. La más ampliamente estudiada en relación al TDAH es la MAOA, enzima que regula los niveles de estos neurotransmisores en el SNC. De manera interesante, los ratones *knockout* para MAOA muestran numerosas alteraciones en las vías de neurotransmisión, como, por ejemplo, elevados niveles de agresividad (Cases et al. 1998). Por otra parte, estudios terapéuticos han sugerido que los inhibidores de MAOA podrían reducir la severidad de los síntomas de TDAH (Spencer et al. 2002a, 2002b). Se han realizado también estudios de asociación con el TDAH entre una repetición en tándem de dos nucleótidos en una región cercana al gen (promotor) y en fuerte desequilibrio de ligamiento con MAOA. Sin embargo, los distintos trabajos realizados muestran resultados muy heterogéneos, es decir, cada estudio asociaba diferentes alelos con el trastorno (Lawson et al. 2003; Jiang et al. 2000, 2001). Por estas razones, estos resultados deben interpretarse cuidadosamente hasta que se lleven a cabo nuevos estudios que determinen la posible asociación entre el TDAH y los múltiples marcadores existentes (Gizer et al. 2009).

El gen de la MAOB se ha estudiado menos ya que al inicio parecía menos prometedor como gen candidato de asociación que MAOA. En el año 2001, Jiang y colaboradores analizaron una repetición de dos nucleótidos en el intrón 2, pero no encontraron evidencia significativa de asociación (Jiang et al. 2001). Sin embargo, en el año 2007 Ribasés y colaboradores encontraron que el gen de MAOB estaba asociado específicamente a TDAH en una población adulta ($P=0,0029$; $OR=1,90$) (Ribases et al. 2007). El mismo año, Li y colaboradores mostraron una asociación de ciertas variantes alélicas de este gen con un riesgo incrementado de TDAH (Li et al. 2007). Además, un reciente estudio llevado a cabo en población española (451 pacientes de TDAH y 400 controles), parece confirmar que existe dicha asociación, mostrando que los portadores del alelo menor de una variante del gen tiene un riesgo incrementado de sufrir TDAH ($OR=1,90$; $p = 0,003$) (Ribases et al. 2009b). Las asociaciones encontradas en este gen requieren ser replicadas en poblaciones independientes, como se ha comentado en otros casos pero, a pesar de la reticencia inicial, parece ser un atractivo candidato de asociación con el TDAH.

1.4.2.2. EL SISTEMA SEROTONINÉRGICO

- **TRIPTÓFANO HIDROXILASA (TPH2)**

La triptófano hidroxilasa cataliza la conversión de triptófano a 5-hidroxitriptófano y es la enzima limitante en la síntesis de 5HT. Ciertos polimorfismos del gen que codifica para esta enzima se han asociado con reacciones agresivas e impulsividad. También se han estudiado polimorfismos de este gen en relación con trastornos afectivos, principalmente el polimorfismo A218C localizado en el intrón 7 (Manuck et al. 1999; Staner et al. 2002). Las primeras asociaciones descritas con el TDAH fueron, los alelos T del SNP rs1843809, el C del SNP rs1384493 y el A del SNP rs1384497 (Sheehan et al. 2005). Aunque con resultados contradictorios, ya que Brookes en el año 2006 caracterizó como alelos de riesgo de TDAH los contrarios (Brookes et al. 2006a) y previamente se había negado esta asociación (Walitza et al. 2005). Recientemente, en un GWAS (Lasky-Su et al. 2008b) y en el proyecto IMAGE (Oades et al. 2008) se confirmó la asociación de este gen con el trastorno, pero en un metanálisis de revisiones posterior se volvió a poner en duda (Gizer et al. 2009).

Las contradicciones obtenidas en el estudio de este gen podrían deberse a un pequeño efecto sobre el fenotipo final. Sin embargo, aunque este efecto sea pequeño, si se confirmara su asociación podría resultar de gran interés para mejorar los procesos diagnósticos del TDAH y para investigar nuevos tratamientos que actúen sobre vías alternativas (Banaschewski et al. 2010).

- **TRANSPORTADOR DE SEROTONINA (SLC4A4 / 5HTT)**

El transportador de 5HT, al igual que el de DA, es una proteína transportadora de solutos responsable de la recaptación de este neurotransmisor de la hendidura sináptica y de introducirlo de nuevo en la neurona presináptica. El gen que codifica para este transportador es probablemente uno de los genes que más se ha estudiado en Psiquiatría, encontrándose asociaciones con una gran variedad de trastornos entre los que se encuentran comportamientos agresivos e impulsivos en niños, por lo que ha sido propuesto como factor causal del TDAH (Anguelova et al. 2003a, 2003b).

El polimorfismo relacionado con el diagnóstico de TDAH, es una inserción/delección de 44 pb en la región promotora del gen que se conoce tiene consecuencias funcionales en el sistema (Seeger et al. 2001). Cuatro de cinco estudios que han examinado esta relación han encontrado evidencia significativa de asociación, lo que implica fuertemente a este gen en la etiología del TDAH (Seeger et al. 2001; Kent et al. 2002; Langley et al. 2003; Manor et al. 2001; Zoroglu et al. 2002). Sin embargo, son necesarios más estudios que clarifiquen esta asociación y que examinen si es específica del subtipo combinado o no, como sugieren algunos estudios (Waldman y Gizer 2006), ya que también hay estudios que niegan la asociación entre polimorfismos del gen de este receptor y el TDAH (Forero et al. 2009).

Respecto a estudios funcionales, el alelo C del SNP rs1042173 localizado en el 3' UTR del gen, se ha asociado a mayor expresión del transportador de serotonina posiblemente debido a un aumento de la estabilidad del ARNm, ya que el SNP se localiza en un sitio de poliadenilación (Curran et al. 2005; Seneviratne et al. 2009).

Como se comentará más adelante en el apartado de **Farmacogenética**, este gen también se ha estudiado por su posible asociación con la respuesta a metilfenidato y los resultados en esta área son prometedores.

- **RECEPTORES DE SEROTONINA (HTR1B y HTR2A)**

De acuerdo con la hipótesis de la implicación del sistema serotoninérgico en la etiopatogenia del TDAH, los receptores de 5HT (HTR1B y HTR2A) son genes interesantes para estudios de genética, ya que modulan el efecto de las concentraciones de 5HT.

Los primeros indicios de la importancia del receptor HTR1B en este trastorno se describieron en ratones *knockout* para este gen, que mostraban comportamientos agresivos e impulsivos y no mostraban el comportamiento hiperlocomotor normal cuando se les administraba amfetamina (Brunner y Hen 1997). Posteriormente, la región cromosómica en la que se localiza este gen se identificó como locus de riesgo de TDAH en un estudio multicéntrico con 273 familias (Hawi et al. 2002) y dos estudios de asociación en familias predominantemente de origen caucásico encontraron una sobretransmisión del alelo G del SNP G841C (Ickowicz et al. 2007; Smoller et al. 2006). En estudios con una muestra mayor también se ha confirmado esta asociación (Hawi et al. 2005; Quist et al. 2003). Además, un metaanálisis publicado recientemente por investigadores de la Universidad de North Carolina, USA (Gizer et al. 2009) y que integra datos de 9 estudios previos, ha establecido que los portadores del alelo G del SNP rs6296 del gen HTR1B presentan un riesgo incrementado de TDAH. Por todo ello, este gen parece un candidato fiable de asociación.

El primer estudio donde se sugirió la implicación del HTR2A en el TDAH, se remonta al año 1999 donde O'Neill y colaboradores indicaban que inhibiendo estos receptores se disminuía el exceso de actividad dopaminérgica y la hiperactividad causada por la administración de amfetamina (O'Neill et al. 1999). Al principio se estudiaron tres polimorfismos de cambio de nucleótido en este gen, T102C, G1438A y His452Tyr (Levitan et al. 2002; Quist et al. 2000) y los resultados fueron positivos, aunque también existen alguna publicación contradictoria (Zoroglu et al. 2002). En los últimos años, tanto en estudios del tipo GWAS como en otros de asociación más específicos, parece que se ha afianzado la asociación entre este gen y el trastorno, con numerosos resultados positivos (Elia et al. 2009a, 2009b, Lasky-Su et al. 2008a, 2008b, Levitan et al. 2002, Li et al. 2006, Oades et al. 2008)

1.4.2.3. OTROS GENES CANDIDATOS

- **FACTORES NEUROTRÓFICOS (BDNF, NGF, CNTFR, NTFs, NTRKs)**

La relación entre los factores neurotróficos y el TDAH es un campo nuevo de investigación que aún se encuentra poco explorado. Durante estos últimos años se han publicado varios estudios sobre la asociación de estos factores y el TDAH, principalmente en los genes: Factor de crecimiento nervioso (NGF), Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), Neurotrofina 3 (NTF3), Neurotrofina 4/5 (NTF4/5), Receptor neurotrófico (CNTFR) y Receptores neurotróficos del tipo tirosinkinasa 1, 2 y 3 (NTRK1, NTRK2, NTRK3) (Kent et al. 2005; Syed et al. 2007; Ribases et al. 2008; Banaschewski et al. 2010; Forero et al. 2009; Gadow et al. 2009; Mick et al. 2009). En concreto, se han encontrado asociaciones significativas con el TDAH principalmente entre el CNTFR (tanto en adultos como en niños), NTF3 y NTRK2 (específicamente en niños), el gen BDNF y el NGF (principalmente el SNP rs4330). A la vista de los resultados positivos que se han obtenido resultaría de gran interés continuar investigando la asociación de factores neurotróficos, neurotrofinas y sus receptores con el TDAH.

- **RECEPTORES NICOTÍNICOS DE ACETILCOLINA (CHRNA4 y CHRNA7)**

Los receptores nicotínicos de acetilcolina son canales iónicos dependientes de ligando formados por 5 subunidades. Numerosas vías de investigación sugieren la implicación del sistema nicotínico en la sintomatología del TDAH. En primer lugar, la administración de nicotina ha demostrado ser eficaz para mejorar los déficits de atención y memoria en adultos diagnosticados con TDAH (Levin et al. 2002). En segundo lugar, la administración de nicotina ha demostrado que altera la actividad de la DA en el cerebro (Grady et al. 1992). Por último, estudios con animales han demostrado una fuerte relación positiva entre la administración de nicotina y la actividad locomotora (Fung y Lau 1989). A nivel genético, se han asociado con un mayor riesgo de padecer TDAH principalmente los receptores CHRNA4 y CHRNA7, siendo los resultados prometedores pero aún insuficientes (Guan et al. 2008; Lasky-Su et al. 2008a, 2008b; Todd et al. 2003; Kent et al. 2001).

- **PROTEÍNA 25 ASOCIADA AL SINAPTOSOMA (SNAP-25)**

Este gen codifica la proteína de 25 kDa asociada al sinaptosoma, una proteína que está involucrada en el crecimiento axonal y en la plasticidad sináptica, así como en el anclaje y fusión de las vesículas sinápticas en las neuronas presinápticas necesaria para la regulación de la liberación de neurotransmisor (Sollner et al. 1993). Por su importante función en la transmisión sináptica, y su asociación con otros trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia y la depresión mayor (Carroll et al. 2009) parece un atractivo candidato de asociación con el TDAH. En 1992, ratones **hemicigóticos** para la delección de este gen (una única copia) mostraron comportamientos hiperactivos lo que podría proporcionar un modelo animal para el estudio del TDAH (Hess et al. 1992). Por todo ello, se ha estudiado, tanto en análisis de tipo GWAS como familiares y de asociación más específicos (Gizer et al. 2009; Banaschewski et al. 2010; Forero et al. 2009; Barr et al. 2000, Brophy et al. 2002, Kustanovich et al. 2003, Mill et al. 2002a,

2004b). Sin embargo, existe cierta controversia acerca de qué polimorfismos son los que se encuentran asociados (Barr et al. 2000, Brophy et al. 2002, Kustanovich et al. 2003, Mill et al. 2002, Mill et al. 2004b). Esta controversia podría ser debida, como se ha comentado anteriormente, a un efecto pequeño sobre el fenotipo final (trastorno de origen multifactorial).

- **RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS (GRIN2A y GRIN2B)**

La neurotransmisión glutamatérgica es el mayor sistema excitatorio del cerebro y está involucrado en la transmisión sináptica rápida, migración neuronal, proliferación y excitabilidad, sinaptogénesis, estabilidad y plasticidad (Turic et al. 2004). Esta vía participa en la transmisión sináptica en procesos motores y de memoria y aprendizaje por lo que resulta de gran interés en relación con el TDAH. El gen para el receptor ionotrópico de glutamato (GRIN2A) que codifica una subunidad del receptor NMDA N2A, se ha estudiado por su relación con el sistema cognitivo tanto en humanos como en animales (Smalley et al. 2002). En este estudio además se describió asociación de la región cromosómica en la que se localiza este gen (16p13) con el TDAH. Posteriormente, un estudio familiar entre 238 familias de origen caucásico, encontró como estadísticamente significativo un SNP del exón 5 (325G>A) (Turic et al. 2004). Aunque en un estudio posterior en 183 familias no se encontró asociación significativa con este polimorfismo ($p=0,74$) (Adams et al. 2004). Por tanto, se requerirían nuevos estudios sobre este gen para evaluar su posible implicación en el TDAH. Cabe destacar que en los estudios de tipo GWAS los polimorfismos de este gen no han alcanzado significación estadística (Lasky-Su et al. 2008a, 2008b), aunque esto podría ser debido a un efecto pequeño.

Respecto al gen del receptor GRIN2B que codifica para otra subunidad de receptores del glutamato, la N2B, se testó la asociación de 9 SNPs en 205 familias con casos de TDAH (Dorval et al. 2007) y se encontró la mayor asociación ($p<0,005$) para el SNP rs22411284. Estudios previos sobre SNPs relacionados con el TDAH, el trastorno de la conducta y el trastorno de oposición desafiante, también habían encontrado asociación entre el GRIN2B y estos trastornos (Comings et al. 2000a). Al igual que en el caso de GRIN2A, los polimorfismos analizados de GRIN2B en estudios de tipo GWAS no alcanzan significación estadística (Lasky-Su et al. 2008a, 2008b), y las asociaciones anteriormente descritas requieren ser replicadas.

Existen otros genes (HLA, CLOCK, ARRB2, HH3R, HES1, AR, FADS2, SYP, NEUROD6, ADAMTS2, IMMP2L, GPC6, ITGAE, SULF2, NOS1, CDH13 y 23, GRIK1, GFOD1, MYT1L...) descritos como asociados a la enfermedad en alguna ocasión, generalmente en estudios de tipo GWAS, pero de los cuales aún existe poca información y es pronto para confirmarlos/descartarlos como genes candidatos de asociación con el TDAH, por lo que requieren un mayor estudio. Algunos de estos genes, como GRIK1 o ITGAE no han sido asociados directamente con el TDAH pero sí con comportamientos impulsivos u otro tipo de trastornos psiquiátricos que podrían estar relacionados y que han sido seleccionados por su potencial interés.

1.4.3. LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

A pesar de todos los estudios que se han mencionado, aún son necesarios nuevos estudios que reproduzcan los resultados de asociación y ligamiento entre los genes candidatos y el TDAH con un mayor número de muestras y donde se analicen marcadores adicionales a los que actualmente se están investigando (Waldman y Gizer 2006). Especialmente sería interesante la replicación de estas asociaciones en población española, donde el número de estudios genéticos que se han realizado es muy inferior al de otras poblaciones.

Actualmente la investigación en genética del TDAH se está orientando hacia cinco vías distintas:

- a) El estudio de **endofenotipos** psiquiátricos
- b) El uso de múltiples marcadores en los genes candidatos en vez de un marcador único, (GWAS) y el uso de algoritmos adecuados para su análisis
- c) La realización de los estudios de asociación/ligamiento particularmente para cada subtipo o por grado de severidad/tipo de sintomatología en vez de tratar a todos los pacientes de TDAH como un único grupo
- d) La inclusión de variables clínicas en los estudios como son, la edad, la edad de aparición del trastorno, el sexo (fenómenos de impronta, genes del cromosoma X) o ciertos factores ambientales importantes
- e) Hay una quinta vía en el estudio de la genética del TDAH que acaba de ser abierta en el año 2010 por Johansson y colaboradores, al publicar que el genotipo materno de ciertos genes serotoninérgicos (TPH1 y TPH2) podría estar implicado en el riesgo del niño a desarrollar TDAH (Johansson et al. 2010). Estos autores postulan que ciertas mutaciones que alteran los niveles de 5HT en la madre harían que durante el desarrollo del feto, éste fuera más susceptible a desarrollar TDAH y por lo tanto que el genotipo de la madre en estos genes podría funcionar como un predictor de riesgo de TDAH.

La implicación clínica de estos estudios sobre las bases genéticas del TDAH es la de poder ayudar a los clínicos a realizar un buen diagnóstico y consecuentemente, a elegir el tratamiento más adecuado para cada paciente en función de su perfil genético y sus características clínicas.

1.4.3.1. ENDOFENOTIPOS

Actualmente está en auge el uso de los endofenotipos en los estudios genéticos de enfermedades complejas. Es decir, el uso de marcadores subyacentes psicológicos o biológicos que pueden ayudar a explicar mejor la acción de los genes en trastornos complejos como es el caso del TDAH (Cardo y Servera 2008; Thapar et al. 2007), ya que se encuentran más directamente relacionados con los genes que los síntomas clínicos. Es un tema que genera gran controversia, ya que si los endofenotipos son seleccionados cuidadosamente pueden ayudar a la identificación de genes de susceptibilidad, pero si no es así, pueden generar resultados tanto falso positivos como falso negativos (Crosbie et al. 2008; Xu et al. 2005). Debemos ser cautelosos en la interpretación de los resultados de los estudios iniciales sobre este tema ya que los tamaños muestrales son aún relativamente pequeños. En la actualidad este tipo de estudios sobre el TDAH se han centrado en respuestas neuropsicológicas y en resultados de técnicas de neuroimagen (Banaschewski et al. 2010).

En el estudio de endofenotipos asociados a TDAH cabe señalar el estudio de Gilbert y colaboradores ya que fue uno de los primeros en centrarse en el TDAH y obtuvo resultados positivos. En este estudio se analizó el efecto de los principales tratamientos farmacológicos para el TDAH, metilfenidato y de la atomoxetina sobre el *short interval cortical inhibition* (SICI). Este trabajo mostró que el SICI es más reducido en niños que padecen TDAH. Esta medida se cuantificó en el córtex motor mediante estimulación magnética transcraneal, además se observó que variaba en función de los diferentes alelos del DAT1 (Gilbert et al. 2006). En los últimos años se han publicado numerosos estudios en este campo que apoyan el uso de endofenotipos para disminuir la heterogeneidad fenotípica existente en el TDAH y aumentar el poder estadístico en los estudios de asociación, buscando asociaciones gen-comportamiento más específicas e incluyéndolos en los modelos genéticos (Wood y Neale 2010). Entre los estudios más recientemente publicados destacan principalmente tres. Goos y colaboradores en su estudio publicado en el año 2009 muestran que el déficit de control inhibitorio es un marcador cognitivo del riesgo genético de padecer TDAH compartido entre padres e hijos y que además es dependiente de cuál sea el origen (si de la madre o del padre) (Goos et al. 2009). Posteriormente en el año 2010 se publicaron otros dos estudios relevantes. Uebel y colaboradores sostienen que el tiempo y precisión de reacción podrían ser endofenotipos neuropsicológicos para el TDAH no dependientes del sexo del paciente (Uebel et al. 2010). Mientras que Gau y colaboradores postulan que disfunciones ejecutoras podrían ser endofenotipos cognitivos de gran utilidad para estudios genéticos tras realizar un profundo análisis entre hermanos sanos y afectados (Gau y Shang 2010).

Por todo ello, el uso de los endofenotipos como medio para mejorar los resultados de los estudios de asociaciones genéticas con el TDAH, es un campo atractivo de aparición reciente, en el que se están concentrando los esfuerzos de muchos investigadores pero en el que todavía queda mucho por profundizar y cuyos resultados deben ser interpretados con cautela.

1.5. TRATAMIENTO

Actualmente el tratamiento farmacológico que se aplica a los pacientes diagnosticados con TDAH en primera instancia, es un estimulante del SNC llamado metilfenidato (**MTF**), obteniéndose resultados positivos en aproximadamente un 45-75% de los casos, en los que se debe ajustar la dosis adecuada de forma personalizada. Tradicionalmente se ajustaba la dosis por kilogramo de peso, si bien hoy se sabe que el ajuste debería ser individual (Montañés-Rada 2009). Otro fármaco de tipo estimulante que clásicamente se ha utilizado es la dextroanfetamina, un agente adrenérgico sintético que es un potente estimulante del SNC, derivado de la efedrina. Sin embargo actualmente no está autorizado su uso en España. Es importante destacar que los estimulantes son los fármacos más efectivos para el tratamiento del TDAH (Dopheide y Pliszka 2009).

Cuando el MTF (o la dextroanfetamina) no produce la respuesta deseada (bien porque no se produce mejoría o porque se presentan efectos secundarios), tradicionalmente se han utilizado otros tipos de tratamientos que incluyen antihipertensivos alfa-agonistas (clonidina y guanfacina), antidepresivos tricíclicos (nortriptilina), inhibidores serotoninérgicos, inhibidores de la recaptación de monoaminas (venlafaxina, bupropion, reboxetina) y antipsicóticos (risperidona) entre otros. Se aplica en este caso el método de ensayo y error, pero estos tratamientos menos específicos también tienen efectos secundarios asociados y menores tasas de eficacia. En la Tabla 3 se muestran de forma esquemática los fármacos que tradicionalmente se han utilizado para el tratamiento del TDAH junto a su mecanismo de acción.

En año 2007 fue comercializado en España el primer tratamiento no estimulante enfocado exclusivamente para el tratamiento del TDAH, la atomoxetina (con el nombre comercial de *Strattera*), habiéndose demostrado previamente su eficacia en ensayos clínicos (Kelsey et al. 2004), por lo que se abrió una nueva vía de tratamiento para el TDAH.

Aunque la eficacia de los tratamientos farmacológicos actuales está demostrada en ensayos clínicos (Wilens et al 2005), un número significativo de pacientes abandona el tratamiento y hay una enorme variabilidad en la tolerancia y aceptación del mismo. Parte de esta variabilidad en la tolerancia y aceptación del tratamiento es debida a factores genéticos (Stein y McGough 2008). Aunque también podría deberse a la existencia de diferentes subgrupos dentro de la enfermedad, ya que los pacientes de TDAH forman un grupo muy heterogéneo en cuanto a la presencia e intensidad de las manifestaciones clínicas. Además, los efectos a largo plazo del tratamiento con estimulantes sobre el desarrollo del cerebro no son del todo conocidos. En la actualidad, no se conoce ningún parámetro clínico o prueba analítica que permita predecir cuál va a ser la progresión del niño a partir del momento del diagnóstico ni si va a mostrar una buena o mala respuesta al tratamiento recibido (Faraone et al. 1998; Herreros et al. 2002; Swanson et al. 2007).

Tabla 3.- Fármacos más utilizados en el tratamiento del TDAH, se dividen en psicoestimulantes y no psicoestimulantes. En la columna de la derecha se encuentra el mecanismo de acción implicado en cada fármaco, indicándose con el símbolo ↑ una estimulación y con el símbolo ↓ una inhibición. Adaptado de Montañés-Rada et al. (2009).

| Fármacos | Mecanismo de acción |
|-----------------------------|---|
| Psicoestimulantes | |
| Anfetaminas | ↑ liberación de DA y NA |
| | ↓ recaptación de DA y NA |
| | ↓ monoaminoxidasas |
| Metilfenidato | ↓ recaptación de DA y NA |
| Pemolina | ↓ recaptación de DA |
| | ↑ liberación de DA |
| Modafinilo | diversos mecanismos que incluyen ↑adrenérgica |
| No psicoestimulantes | |
| Antidepresivos tricíclicos | ↓ recaptación de NA |
| Atomoxetina | ↓ recaptación de NA |
| Bupropión | ↓ recaptación de DA y NA |
| Reboxetina | ↓ recaptación de NA |

Por todo ello, el TDAH permanecería como una vía abierta para el desarrollo de nuevos tratamientos en la que se debe continuar investigando para poder mejorar la calidad de vida de los enfermos, en especial de los que presentan una mala respuesta a los fármacos disponibles en este momento y por lo tanto presentan peor evolución.

Es importante destacar, además, que el tratamiento de esta enfermedad debe responder a un abordaje multidisciplinar (apoyo emocional y psicopedagógico) y no ser únicamente de tipo farmacológico. Este punto es especialmente importante en el caso del TDAH, ya que los fármacos no curan la enfermedad, funcionan sintomáticamente, regulando la función cerebral de manera que los síntomas del trastorno se atenúen y no impidan el desarrollo educacional, emocional y social normal. De hecho a principios del año 2010 se ha constituido en España la primera Unidad Integral Multidisciplinar para el diagnóstico y tratamiento del TDAH en Lérida en la que psiquiatras y neuropediatras trabajarán conjuntamente por primera vez.

1.5.1. TRATAMIENTO ESTIMULANTE: METILFENIDATO (MTF)

El MTF fue patentado en 1954 y fue inicialmente prescrito para el tratamiento de la depresión, el síndrome de fatiga crónica y la narcolepsia, entre otros trastornos. A principios de los años 40 del siglo XX se comenzó a usar en niños con TDAH de forma empírica. Hoy en día el MTF es el fármaco más utilizado en el mundo para el tratamiento de la sintomatología del TDAH. Los nombres comerciales más comunes del metilfenidato son Ritalin[®], Concerta[®], Rubifén[®] y Medikinet[®] presentándose tanto en forma de liberación inmediata (**MTF-LI**), prolongada (**MTF-LP**), o ambas.

En la Figura 7 se muestran las curvas farmacocinéticas para tres de los medicamentos que tienen MTF en su composición: Rubifén[®], Medikinet[®] y Concerta[®]. Existe una correlación directa entre el efecto clínico y los niveles de fármaco en sangre, ya que estudios farmacocinéticos han mostrado que el inicio de los efectos terapéuticos ocurre durante la fase de absorción del fármaco (Dopheide y Pliszka 2009). No hay ningún rango terapéutico de los niveles en sangre de MTF establecido y cada paciente tiene una curva dosis-respuesta única.

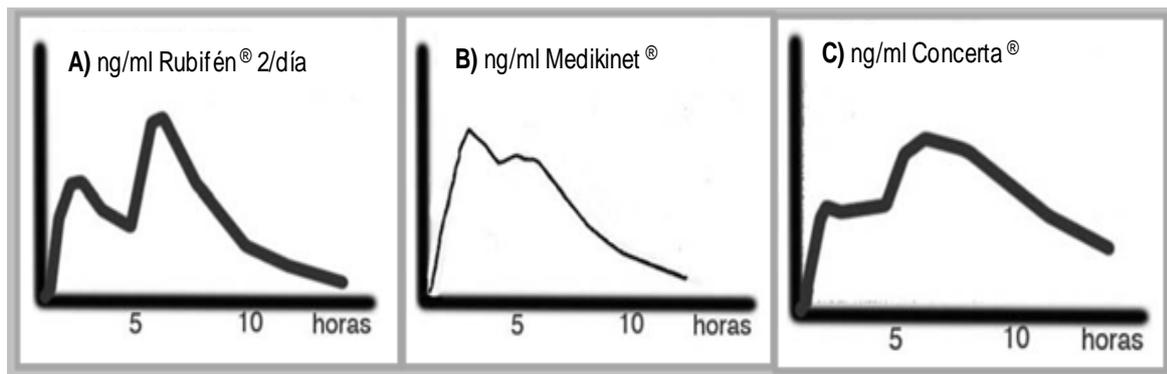


Figura 7.- Curvas farmacocinéticas para 3 de las variedades de MTF comercializadas en España: A) Rubifén[®]; B) Medikinet[®]; C) Concerta[®]. En este aspecto es interesante remarcar que en el caso de Rubifén son necesarias dos dosis al día, mientras que el Medikinet y Concerta solamente se requiere una única dosificación diaria. Adaptado de Dopheide y Pliszka (2009).

El MTF es un estimulante del SNC (Fone y Nutt 2005), con afinidad de unión para los transportadores de DA y para el transportador de NA. No se ha observado unión directa del MTF al transportador de 5HT (SERT) (Markowitz et al 2006), aunque sí muestra una ligera inhibición de la MAO y la forma dextro se considera más beneficiosa que la levo, al igual que ocurre con las anfetaminas.

La razón por la que el MTF mejora la sintomatología del TDAH, reduce los comportamientos impulsivos y facilita la concentración (Wilens et al 2005), no está muy clara, ya que las bases neurobiológicas de la enfermedad tampoco lo están. El MTF es un inhibidor de la recaptación de DA, por lo que aumenta los niveles de DA en el cerebro bloqueando parcialmente los receptores que la retiran de la hendidura sináptica (Volkow et al 1998) como se muestra en la

Figura 8. El hecho de que el MTF mejore los síntomas del TDAH apoya la teoría de que la enfermedad se produce por una disfunción dopaminérgica, aunque como ya se ha descrito anteriormente, también existen otras teorías, como la noradrenérgica y la serotoninérgica, que podrían estar relacionadas con la etiopatogenia del trastorno.

A pesar de ser el tratamiento de primera instancia para los pacientes de TDAH, un 20 % de los pacientes no responde adecuadamente, bien porque la evolución de los síntomas no es la adecuada, bien porque los efectos secundarios que se producen superan a los beneficios obtenidos. Es en estos casos cuando se recurre a otro tipo de medicación.

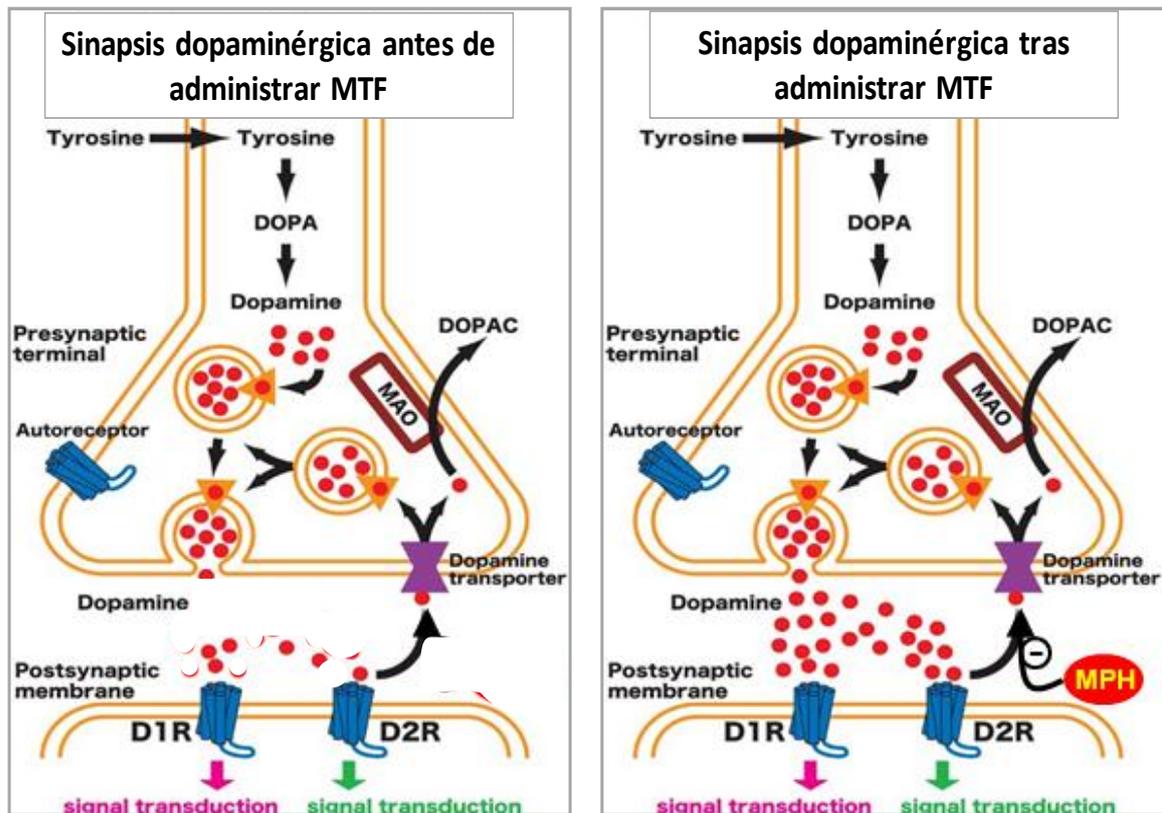


Figura 8.- Esquema que muestra un terminal sináptico de una neurona dopaminérgica y los receptores dopaminérgicos de la neurona contigua antes de recibir MTF y tras la dosis de este fármaco. En la segunda imagen, se observa cómo al estar bloqueado el recaptador de DA de la neurona presináptica por acción del MTF, la concentración de DA aumenta en la hendidura sináptica. Imagen adaptada de Stahl (2002).

Las ventajas del MTF de acción inmediata (**MTF-LI**) son su bajo coste, su flexibilidad y los mejores resultados en estudios cuantitativos en dosis de tres veces al día. Las ventajas del MTF de acción prolongada (**MTF-LP**), por el contrario, radican en un menor riesgo de abuso y sobre todo en el menor número de tomas, lo que implica un mejor cumplimiento de la medicación y disminuye el riesgo de estigmatización del niño en el entorno escolar (Montañés-Rada et al. 2009).

La recomendación clínica es iniciar el tratamiento con un estimulante de acción inmediata para luego mantener o cambiar a uno de acción prolongada. También se podría comenzar directamente con uno de acción prolongada pero sería necesario escalar la dosis.

Sin embargo, todas las presentaciones de MTF, tanto MTF-LI como MTF-LP, tienen cabida en la clínica diaria, ninguna sustituye completamente a las otras y con frecuencia es necesaria la combinación de ambos o incluso la combinación con otros fármacos tanto durante el día como a lo largo de la semana (Montañés-Rada et al. 2009). Si el paciente no responde a este tipo de estimulantes la indicación más lógica sería probar con atomoxetina en primera instancia y posteriormente otros tratamientos menos específicos.

1.5.2. TRATAMIENTO NO ESTIMULANTE: ATOMOXETINA (ATX)

La ATX es el primer fármaco no estimulante que ha sido aprobado para el tratamiento del TDAH en niños, adolescentes y adultos. En España se comercializa desde el año 2007 con el nombre de Strattera[®] y actúa como inhibidor selectivo del recaptador de NA de la neurona presináptica (NET), presentando 290 veces menor afinidad por los transportadores de DA que por el de NA (Bymaster et al. 2002).

Este fármaco presentaría la ventaja frente al tratamiento estimulante clásico de una menor susceptibilidad al abuso y menor presencia de efectos secundarios como insomnio e influencia en el crecimiento, además de que los efectos adversos iniciales tienden a disminuir con el tratamiento continuado (en ensayos clínicos la tasa de abandonos por efectos adversos fue similar a placebo). Se han realizado numerosos ensayos clínicos, varios de ellos pediátricos con cerca de 4000 niños para comprobar tanto su eficacia (Kelsey et al. 2004) como su seguridad (Wernicke et al. 2002), en ensayos aleatorizados, doble-ciego y controlados con placebo. Aunque su eficacia general es menor a la del metilfenidato en estudios a corto plazo, podría ser considerado también como un fármaco de primera línea en ciertos casos. Especialmente en pacientes con determinados trastornos comórbidos como el abuso de drogas, el trastorno de ansiedad o la presencia de tics (Hammerness et al. 2009) se ha visto que podría funcionar mejor que el metilfenidato. En pacientes que presenten una mala respuesta a MTF, se ha demostrado una respuesta positiva a ATX en cerca del 50% de los casos que no respondían al tratamiento estimulante. Sin embargo, también hay que tener en cuenta que la totalidad del efecto de la ATX no se produce hasta varios meses (3-4 meses) después de haber comenzado el tratamiento, mientras que los efectos del metilfenidato se aprecian en semanas o incluso días (Hammerness et al. 2009).

La forma de administración es en una única dosis por la mañana (0,5-1,2 mg/kg/día), proporcionando una progresiva y sostenida mejoría de los síntomas del TDAH durante todo el día. En relación a la absorción y distribución de la atomoxetina, tras una administración oral

alcanza niveles plasmáticos máximos al de 1 o 2 horas, muestra además una gran unión a proteínas (98%) especialmente a la albúmina (Sauer et al. 2005).

Existen tres vías metabólicas implicadas en el aclaramiento de la ATX; hidroxilación del anillo aromático, hidroxilación bencílica y N-desmetilación. La enzima hepática CYP2D6 es la principal vía metabólica de la atomoxetina, siendo el primer metabolito oxidativo la 4-hidroxiatomoxetina (Hammerness et al. 2009).

Se considera que una disfunción noradrenérgica juega un papel fundamental en la fisiopatología del TDAH (Biederman et al. 1999), al mismo tiempo que la función noradrenérgica se asocia con la modulación de las funciones cognitivas superiores, como son la atención, la vigilancia, la alerta y las funciones ejecutivas. Más concretamente, la disfunción noradrenérgica en la corteza prefrontal se asocia con déficits en el control inhibitorio de la conducta característica del TDAH. Estos déficits inhibitorios causan alteraciones en la memoria de trabajo, en la autorregulación e interiorización del lenguaje. La mejoría de los síntomas del TDAH con el tratamiento con ATX apoyaría la hipótesis de disfunción noradrenérgica en el TDAH.

En estudios animales, se ha visto que la ATX parece aumentar la DA en la corteza prefrontal en una magnitud similar a la NA, debido a que en esa región la inhibición es compartida para las monoaminas (Hammerness et al. 2009). En otras regiones del cerebro ricas en DA como el núcleo accumbens o el estriado no se alteran los niveles de DA en experimentos con ratas. Además, en otras regiones cerebrales de la rata con alta densidad de transportadores de NA (NET), como la corteza occipital, el hipocampo dorsal y cerebelo, la ATX aumenta los niveles de este neurotransmisor de forma rápida y continuada (Bymaster et al. 2002).

En estudios realizados mediante técnicas de microdiálisis en corteza prefrontal de rata (Sauer et al. 2005; Homer et al. 2007) se ha encontrado que tanto la ATX como el MTF aumentan los niveles extracelulares de histamina, que juega también un papel importante en la atención, el aprendizaje y la memoria. Mientras que la respuesta clínica a los fármacos para el tratamiento del TDAH se atribuye típicamente a la regulación de los neurotransmisores dopamina y noradrenalina. Este hallazgo podría sugerir que el aumento de la liberación de histamina también podría estar influyendo en su eficacia como tratamientos para el TDAH.

2. FARMACOGENÉTICA

La Farmacogenética es el estudio de cómo la variabilidad genética afecta a la respuesta a los fármacos en cada individuo (Prince 2006). Fue en el año 1909, cuando Garrod, fundador de la Bioquímica genética, sugirió por primera vez que las variaciones en el metabolismo eran características que se heredaban a los descendientes (Dauden 2006). Pero pasaron 50 años hasta que en el año 1959 Fredrich Vogel empleó por primera vez este término, aunque dos años antes, en 1957, Arno Motulsky ya había establecido que existía una relación causal entre determinadas “alteraciones” genéticas y las diferencias interindividuales en la respuesta a fármacos (Motulsky 1957).

Hay muchas razones por las que un paciente puede no responder a un fármaco o sufrir efectos secundarios, entre las que se encuentran, haber recibido una dosis errónea, interacciones entre fármacos o alergias farmacológicas. No obstante, la predisposición genética permanece como la causa más desconocida de la respuesta inadecuada al tratamiento farmacológico (Spear et al. 2001). En la Tabla 4 se muestran las tasas de eficacia farmacológica en distintas áreas terapéuticas.

Tabla 4.- Tabla que recoge las tasas de eficacia farmacológica en diferentes áreas terapéuticas. Obsérvese que en ningún caso esta eficacia es superior al 80% y que en ciertas áreas terapéuticas, como la Oncología, estos valores descienden hasta un 25% de eficacia farmacológica. Adaptada de (Spear et al. 2001).

| Área terapéutica | Tasa de eficacia (%) |
|-----------------------|----------------------|
| Alzheimer | 30 |
| Analgésicos (COX2) | 80 |
| Asma | 60 |
| Arritmias cardíacas | 60 |
| Depresión | 62 |
| Diabetes | 57 |
| Hepatitis C | 47 |
| Incontinencia | 40 |
| Migrañas (Agudas) | 52 |
| Migrañas (Profilaxis) | 50 |
| Oncología | 25 |
| Osteoporosis | 48 |
| Artritis reumatoide | 50 |
| Esquizofrenia | 60 |

La Farmacogenética abarca la influencia genética tanto en la **Farmacocinética** como en la **Farmacodinamia**. De forma esquemática se muestra este hecho en la Figura 9. Esta área del conocimiento tiene como objetivo la predicción y prevención del riesgo de toxicidad y/o fracaso terapéutico en la administración de fármacos (Benitez 2008). La Farmacogenética cubre una

amplia área que incluye la investigación básica de descubrimiento de nuevos fármacos, las bases genéticas de la farmacocinética, desarrollo de nuevos fármacos, así como los análisis genéticos del paciente y la utilidad clínica de los mismos (Spear et al. 2001).

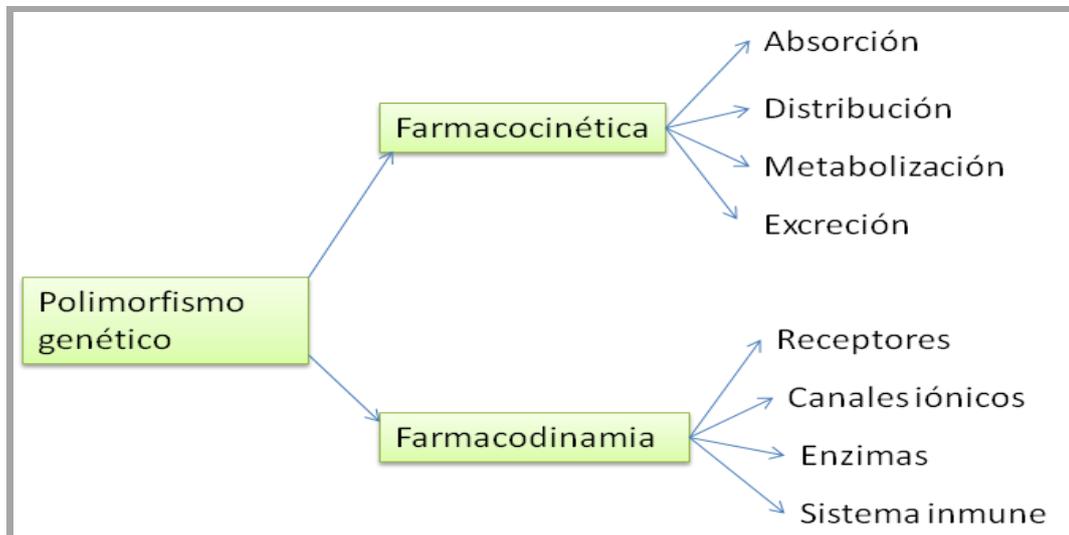


Figura 9.- Esquema que muestra a qué niveles puede estar condicionada por un polimorfismo genético la acción farmacológica de un medicamento. Influirá tanto en el proceso de farmacocinética como en el de farmacodinamia.

Los tres grandes grupos de macromoléculas en los que tradicionalmente se ha centrado la Farmacogenética son principalmente los transportadores, los receptores y las enzimas metabolizadoras de fármacos, siendo el hígado el principal órgano relacionado con el metabolismo de los fármacos, pero también riñón, pulmón, mucosa intestinal, plasma y tejido nervioso (Lares-Asseff y Trujillo-Jiménez 2001):

- 1) Transportadores. - El papel que juegan los transportadores en los procesos de absorción, distribución y excreción de los medicamentos es esencial, condicionando sus procesos farmacocinéticos en el organismo (ATP-binding cassette, bombas transportadoras, proteínas de membrana...).
- 2) Receptores. - Al administrar un fármaco la mayoría de ocasiones lo que se pretende es su interacción con la diana terapéutica. Las dianas terapéuticas más comunes son los receptores, y de su interacción depende la respuesta farmacológica deseada (receptor β -adrenérgico, dopaminérgico...).
- 3) Enzimas metabolizadoras. - Tras la administración de un fármaco, el organismo procede a su eliminación, bien por excreción sin modificación alguna del mismo o bien tras un proceso previo de biotransformación, formándose metabolitos intermedios que podrán ser activos o inactivos. Este proceso por lo general se realiza en dos fases, lo que da origen a los denominados metabolitos de fase I (reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis

principalmente) y metabolitos de fase II (reacciones de conjugación). Además, no sólo son responsables del metabolismo del fármaco directamente, sino que también pueden actuar sobre sustancias endógenas implicadas en la acción del medicamento. Existen en el organismo humano más de treinta familias de enzimas metabolizadoras, en las que los polimorfismos genéticos constituyen la regla.

La frase que resumiría los objetivos de la Farmacogenética sería la de poder utilizar, “**el fármaco correcto, efectivo y seguro a la dosis correcta para el paciente adecuado y a un coste asumible**” (Lesko 2007). Hasta hace pocos años, había uno o dos test farmacogenéticos (principalmente Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción, RFLPs) de uso rutinario en clínica. Sin embargo, el desarrollo de nuevas metodologías está haciendo posible el análisis de decenas de genes con sus múltiples variantes alélicas con una fiabilidad, eficacia y rapidez impensable hace solamente un lustro y a unos costos asumibles para los sistemas de salud, sobre todo si se tiene en cuenta el ahorro en paliar la toxicidad y la mayor eficacia terapéutica que todo ello puede conllevar. Por lo que, a medida que el coste de genotipar a un paciente disminuye, en un futuro cercano podría convertirse en realidad una medicina realmente personalizada, en la que el clínico pueda decidir el tratamiento de forma individualizada para cada paciente en base a su genotipo.

La Psiquiatría es uno de los campos que se está beneficiando de los avances que se están produciendo, y principalmente se han realizado estudios de la farmacogenética de antipsicóticos, antidepresivos, anticonvulsivantes y fármacos estabilizadores del ánimo con resultados muy prometedores y de aplicación en clínica (Kirchheiner et al. 2010; Zandi y Judy 2010; Lohoff y Ferraro 2010). Idealmente los estudios de farmacogenética nos conducirían a protocolos de tratamiento individualizados en un futuro cercano en los que se consultaría un panel informativo de marcadores genéticos antes de iniciar un tratamiento farmacológico (Nemoda et al. 2009).

Es importante diferenciar el concepto de Farmacogenética del de **Farmacogenómica**, que es un término más reciente que intenta utilizar la información sobre las bases genéticas y moleculares del tratamiento de las enfermedades (genes que se alteran por efecto del tratamiento) para identificar nuevas dianas terapéuticas y desarrollar nuevos tratamientos farmacológicos (Aitchison y Galitski 2003; Stein y McGough 2008).

2.1. FARMACOGENÉTICA DEL TDAH

Actualmente el tratamiento del TDAH se determina a menudo empíricamente mediante el método de prueba y error con diferentes dosis y medicamentos hasta conseguir la respuesta deseada con el menor número de efectos secundarios posibles (Stein y McGough 2008). Incluso entre los que responden favorablemente a la medicación, existe una gran variabilidad interindividual en la dosis óptima, duración del efecto y tolerabilidad.

Por otro lado, ensayos clínicos han demostrado que menos del 40% de pacientes que habían sido estabilizados con MTF continúan con la medicación tras doce meses de tratamiento (Stein y McGough 2008), aunque aquéllos que continuaban con la terapia farmacológica mostraban una importante mejoría en los síntomas sobre la línea basal. Los autores concluyen que son los efectos secundarios y la tolerabilidad lo que lleva a los pacientes a abandonar el tratamiento, por lo que parece claro que, aunque la eficacia de los tratamientos estimulantes está probada en el corto plazo, existen considerables obstáculos en el tratamiento a largo plazo. Por esta razón, aunque la mayor parte de estudios sobre la farmacogenética del TDAH que han sido publicados se han centrado en buscar predictores genéticos de la mejoría de los síntomas, una aplicación clínica más práctica y que no debería relegarse a un segundo plano es la predicción de la aparición de efectos secundarios y tolerabilidad a la medicación (Stein y McGough 2008). Una indicación de mayor predisposición a efectos secundarios podría ayudar al clínico con la elección del fármaco idóneo, además de poder ajustar el fármaco y la dosis a cada paciente de forma personalizada.

Los estudios de farmacogenética del TDAH tradicionalmente se han centrado en los genes de las vías catecolaminérgicas y en la respuesta a metilfenidato. Sin embargo, los esfuerzos futuros deberían encaminarse a examinar un rango más amplio tanto de fármacos estimulantes como no estimulantes (Stein y McGough 2008). En el año 2009, en la Conferencia sobre Genética Molecular celebrada en Bruselas, se establecieron una serie de principios a tener en cuenta para llevar a cabo futuros estudios de farmacogenética del TDAH. Entre estos principios se incluía que los estudios futuros sean metodológicamente rigurosos (aleatorizados y controlados con placebo), que la respuesta se mida de formas diferentes y en distintos puntos de tiempo, que se mida tanto la mejoría de síntomas como la aparición de efectos secundarios, que se examinen múltiples genes, que el tamaño muestral sea suficiente y que se lleven a cabo los controles de genotipado necesarios, entre otros (Stein y McGough 2008).

A continuación se detallan los genes implicados en la diferente respuesta a los fármacos utilizados para el tratamiento del TDAH. Se han separado en dos grupos: los asociados con la respuesta a metilfenidato y los que estarían implicados en la respuesta a atomoxetina, que como se ha comentado anteriormente serían los dos tratamientos principales que se aplican en la rutina clínica para el tratamiento del TDAH. En la Tabla 5 se muestra un resumen de todos ellos.

Tabla 5.- Tabla recapitulativa donde se muestran los principales genes cuyos polimorfismos se han descrito como asociados con una buena/mala respuesta a metilfenidato y atomoxetina. Buena/mala respuesta implica tanto la mejoría de los síntomas asociados a TDAH como la aparición de efectos secundarios asociados al tratamiento. VNTR indica las repeticiones en tándem de número variable. En la columna de la derecha se indican los principales artículos en los que se han descrito. Entre interrogaciones se marcan las asociaciones publicadas una única vez y que no están confirmadas.

| RESPUESTA A METILFENIDATO | | | |
|---------------------------|----------------------------------|------------------------|---|
| GEN | FUNCIÓN | POLIMORFISMO | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS |
| DAT1 | Transportador dopamina | VNTR 3'UTR | Cheon et al. 2005; Contini et al. 2010; Froehlich et al. 2010; Kieling et al. 2010; Kim et al. 2005; Kirley et al. 2003; Kooij et al. 2007; Leddy et al. 2009; McGough et al. 2009; Mick et al. 2006; Roman et al. 2002; Stein et al. 2005; Szobot et al. 2010; Van der Meulen et al. 2005; Winsberg y Comings 1999; Zeni et al. 2007 |
| DRD4 | Receptor dopamina | VNTR exón 3 | Cheon et al. 2007; Froehlich et al. 2010; Hamaman et al. 2004; Kieling et al. 2010; Langley et al. 2005; McGough et al. 2006, 2009; Roman et al. 2002; Szobot et al. 2010; Van der Meulen et al. 2005; Zeni et al. 2007 |
| CES1 | Carboxilesterasa 1 | rs71647871 | Nemoda et al. 2009; Zhu et al. 2008 |
| COMT | Catecol-O-metiltransferasa | Val158Met | Armero et al. 2005; Cerasa et al. 2010; Cheon et al. 2008; Froehlich et al. 2010; Gruber et al. 2006; Kereszturi et al. 2008; Kieling et al. 2010; McGough et al. 2009 |
| SLC6A4 | Transportador serotonina | Ins 44bp promotor | Kieling et al. 2010; McGough et al. 2009; Seeger et al. 2001; Thakur et al. 2010; Tharoor et al. 2008; Zeni et al. 2007 |
| ADRA2A | Adrenoceptor α 2A | -C1291G | Cheon et al. 2009; da Silva et al. 2008; Polanczyk et al. 2007; Stein y McGough 2008; Froehlich et al. 2010; Kieling et al. 2010 |
| NET1 | Transportador noradrenalina | G1278A | Cheon et al. 2009; Stein y McGough 2008; Yang et al. 2004; Froehlich et al. 2010; Kieling et al. 2010 |
| SNAP25 | Proteína asociada al sinaptosoma | rs3746544 rs1051312 | McGough et al. 2006, 2009; Muller et al. 2005; Froehlich et al. 2010; Kieling et al. 2010 |
| LPHN3 | Latrofilina 3 | - | Arcos-Burgos et al. 2010 |

| RESPUESTA A ATOMOXETINA | | | |
|-------------------------|-----------------------------|--------------------------------|--|
| GEN | FUNCIÓN | POLIMORFISMO | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS |
| CYP2D6 | Citocromo 2D6 | Más de 90 | Stein y McCough 2008; Ingelman-Sundberg et al. 2007; Sauer et al. 2005; Ring et al. 2002 |
| ¿DAT1? | Transportador dopamina | VNTR 3'UTR | Gilbert et al. 2006 |
| ¿DRD4? | Receptor dopamina | VNTR exón 3 | Stein y McCough 2008 |
| ¿NET1? | Transportador noradrenalina | 36 SNPs entre los exones 4 y 9 | Ramoz et al. 2009 |

2.1.1. GENES ASOCIADOS CON RESPUESTA A METILFENIDATO

2.1.1.1. TRANSPORTADOR DE DOPAMINA (DAT1)

El transportador de DA DAT1 ha sido ampliamente estudiado en relación a la respuesta a MTF (Kooij et al. 2007; Van der Meulen et al. 2005) además de por su asociación con un mayor riesgo a padecer TDAH como se ha descrito anteriormente en el apartado de Genética del TDAH. Es lógico pensar en este gen al hablar sobre Farmacogenética del MTF ya que es precisamente sobre este transportador sobre el que actúa dicho fármaco, pero a pesar de que parece un claro candidato, existe gran controversia en los resultados que se han obtenido en los estudios realizados sobre la repetición en tándem (VNTR) de la región 3'UTR. Se ha publicado que los individuos con el alelo de 10 repeticiones (10R) muestran aproximadamente un 50% de mayor densidad de transportadores dopaminérgicos en el estriado (Winsberg y Comings 1999), lo que a priori podría sugerir una diferente respuesta de estos individuos al tratamiento con MTF.

En varios estudios se ha asociado la variante de 10R (480 pb) a no-respondedores (Cheon et al. 2005; Roman et al. 2002) mientras que en otros estudios asocian la posesión de uno o dos alelos de 10R con una mayor mejoría de los síntomas tras recibir MTF (Kirley et al. 2003; Stein et al. 2005). Por el contrario, otros autores no encontraron asociación entre esta VNTR y la respuesta a MTF (Kim et al. 2005; McGough et al. 2009; Van der Meulen et al. 2005; Contini et al. 2010). Si bien es cierto que el tamaño muestral (y por tanto la potencia estadística), la edad y el origen étnico de las poblaciones varían entre los diferentes estudios, esta asociación está lejos de ser concluyente. Por otro lado, Szobot y colaboradores postulan que es la combinación del alelo 10R/10R de DAT1 con el de 7R del receptor de dopamina DRD4 la que tiene efecto sobre la respuesta a MTF (Szobot et al. 2010).

También se han realizado estudios de este polimorfismo y la aparición de efectos secundarios, como por ejemplo la disminución del apetito asociada a la toma de estimulantes (Ledy et al. 2009) pero sería interesante poder replicar estos resultados.

2.1.1.2. RECEPTOR DE DOPAMINA D4 (DRD4)

El receptor de DA DRD4 también se ha analizado por su posible implicación en la respuesta a MTF, especialmente la VNTR localizada en el exón 3 que también se ha asociado con un mayor riesgo a padecer TDAH. Sin embargo, los resultados de estos estudios son controvertidos. En relación a la sintomatología, Hamarman y colaboradores, mostraron que los pacientes con al menos un alelo de 7 repeticiones requerían mayores dosis de MTF para mostrar una reducción óptima de la sintomatología (Hamarman et al. 2004). Cheon y colaboradores, en cambio, describieron que los niños homocigotos para la variante de 4R eran más susceptibles de exhibir respuestas positivas en los test comportamentales que aquéllos con otros genotipos (Cheon et al. 2007). Por otro lado, existen numerosos estudios que no han encontrado asociación entre este polimorfismo de DRD4 y una mejora en la sintomatología asociada a TDAH (McGough et al.

2006; Roman et al. 2002; Stein y McGough 2008; Van der Meulen et al. 2005; Zeni et al. 2007). Como se ha comentado en el párrafo anterior, Szobot y colaboradores defienden que la combinación del alelo 10R/10R de DAT1 con el 7R de DRD4 la que tiene efecto sobre la respuesta a MTF (Szobot et al. 2010).

Al igual que con DAT1, también se han realizado estudios que evalúan una posible asociación de este polimorfismo con la aparición/reducción de efectos secundarios como pérdida de apetito e insomnio. Hay estudios que muestran resultados de asociación tanto positivos como negativos (Langley et al. 2005; McGough et al. 2006, 2009; Roman et al. 2002). Estos resultados contradictorios podrían deberse a diferencias metodológicas en el diseño de los estudios, a los regímenes de dosis farmacológicas y a las medidas realizadas, tal y como defienden Froehlich y colaboradores (Froehlich et al. 2010).

2.1.1.3. CARBOXILESTERASA 1 (CES1)

La mayoría de estudios que han investigado la respuesta a MTF se han centrado en las variantes genéticas de las dianas farmacológicas (transportadores y receptores como se ha comentado en los párrafos anteriores) y se ha prestado poca atención a la variabilidad genética del metabolismo de fármacos (Nemoda et al. 2009, Roman et al. 2002). El MTF se convierte en ácido ritalínico (metabolito inactivo) mediante la carboxil esterasa (CES), siendo la CES1 del hígado la responsable de la hidrólisis tanto de la forma D como L del MTF. Esta enzima fue seleccionada por dos grupos de investigadores para hacer un estudio farmacogenético de la respuesta del MTF (Nemoda et al. 2009; Roman et al. 2002). En estudios previos ya se habían identificado dos variantes de CES1 con actividad enzimática reducida (Zhu et al. 2008), y Nemoda en el año 2009, en una población húngara, confirmó la asociación de una de estas variantes Gly143Glu (rs71647871) con la respuesta a MTF. Encontró que los pacientes portadores del alelo Glu (heterocigotos, ya que en la población de estudio no hallaron ningún individuo homocigoto Glu-Glu) necesitaban menores dosis de MTF para mostrar mejoría en la sintomatología asociada al TDAH. La variante Glu está asociada con una actividad enzimática reducida (un 21% de la actividad catalítica normal), por lo que los pacientes con este polimorfismo genético podrían presentar mayores niveles plasmáticos de MTF y por lo tanto requerir menor dosis.

Pero hasta la fecha solamente existe este estudio acerca de CES1 en una única población con TDAH, por lo que estos resultados deberían ser replicados con mayor número de individuos en una población independiente para ser confirmados.

2.1.1.4. CATECOL-O-METILTRANSFERASA (COMT)

La COMT es la principal enzima que participa en las rutas metabólicas de degradación de catecolaminas endógenas como se ha comentado anteriormente, catalizando la reacción de O-metilación. Existen dos formas de esta enzima: la primera que es soluble y se encuentra en el

citoplasma de las células de todos los tejidos y la segunda que se encuentra ligada a la membrana y es cerebral exclusivamente (Cerasa et al. 2010). Entre los sustratos de esta enzima se encuentran fármacos antidepresivos (mirtazapina), piridoxina, antipsicóticos (olanzapina) y el MTF en el caso del tratamiento del TDAH.

La transición de una guanina (G) a una adenina (A) en el codón 108 de la COMT soluble, o en el 158 de la unida a membrana repercute en un cambio aminoacídico (Valina a Metionina). Este cambio afecta a su actividad enzimática y en base a ello se definirían los siguientes fenotipos (Armero et al. 2005a) :

- a) Actividad enzimática baja.- Individuos con genotipo *Met/Met* presentarían una actividad enzimática reducida siendo la frecuencia de este genotipo en población española de un 35%.
- b) Actividad enzimática intermedia.- Correspondería al genotipo *Met/Val* y se presenta en un 44% de la población española.
- c) Actividad enzimática elevada.- Los homocigotos para el alelo valina (*Val/Val*), que representan el 21% de la población y presentarían una actividad elevada del enzima.

Existen diversos estudios que han relacionado la variante Val con una mejor respuesta a MTF (Cheon et al. 2008; Kereszturi et al. 2008; Kieling et al. 2010) además de su posible asociación al TDAH que ya se ha comentado, no habiendo ningún resultado negativo. Por otro lado también se ha relacionado esta variante con la aparición de efectos secundarios como son la irritabilidad (McGough et al. 2009) y dificultades para conciliar el sueño (Gruber et al. 2006). Estos resultados parecen indicar que este gen es un candidato atractivo para la predicción de respuesta a MTF.

2.1.1.5. TRANSPORTADOR DE SEROTONINA (SLC6A4)

El primer estudio en el gen que codifica para el transportador de 5HT (SLC6A4 ó 5HTT) por su posible asociación con la respuesta a MTF, analizó una inserción de 44 pb localizada en el promotor que había sido previamente asociada con un mayor riesgo de padecer TDAH (Seeger et al. 2001). Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la combinación de los alelos de 7R de la VNTR de DRD4, el alelo largo del transportador de serotonina (5HTT-LL) y una menor mejoría de los síntomas tras la administración de MTF, por lo que postulaban esta combinación como un posible marcador predictor de malos respondedores a MTF. En dos estudios posteriores, (Tharoor et al. 2008; Zeni et al. 2007) no se encontró asociación entre este gen y la respuesta a MTF. Pero un estudio más reciente (McGough et al. 2009), replicó esta asociación y además encontró una nueva de una VNTR localizada en el intrón 2.

Estos estudios parecen indicar que el gen SLC6A4 estaría implicado de alguna manera en la respuesta a MTF pero sería interesante poder confirmar los resultados en poblaciones independientes y hacer estudios de gen candidato.

2.1.1.6. ADRENOCEPTOR α 2A Y TRANSPORTADOR DE NORADRENALINA (ADRA2A y NET1)

Se conoce que el MTF bloquea el transportador de NA además del de DA; sin embargo pocos estudios son los que han investigado el efecto del MTF en el sistema noradrenérgico (Cheon et al. 2009). Los genes que codifican para el transportador de NA (NET1/SLC6A2) y el adrenoceptor α 2A (ADRA2A), constituyentes esenciales de la transmisión noradrenérgica y que además se han asociado también con el TDAH, se convertirían por lo tanto en atractivos candidatos para estudiar su posible implicación en la variabilidad de respuesta a MTF (Stein y McGough 2008).

En el año 2004, Yang y colaboradores encontraron que aquéllos individuos homocigotos para el alelo A menos común del SNP G1278A de NET1, mostraban una menor reducción de síntomas comparados con el resto (Yang et al. 2004). Los autores postularon que aunque este cambio aparentemente no tiene una repercusión funcional sobre el transportador podría estar en desequilibrio de ligamiento con algún otro alelo que sí la tuviera.

Tres estudios en poblaciones diferentes (Cheon et al. 2008c, da Silva et al. 2008, Polanczyk et al. 2007) han encontrado asociación entre el polimorfismo -C1291G del gen ADRA2A y la respuesta a MTF. Según estos estudios, los individuos homocigotos para el alelo G mostrarían una mejor respuesta al tratamiento; además de numerosos estudios previos en los que se ha asociado este polimorfismo con los síntomas de inatención como se ha descrito en el apartado de genética del TDAH, por lo que parece que este SNP juega un papel importante en la etiopatogenia del TDAH y parece lógico pensar que también en la mejoría de síntomas asociada al tratamiento con MTF. Sin embargo, serían necesarios futuros estudios que confirmasen estas asociaciones y en poblaciones diferentes para poder utilizarlos como marcadores para predecir la respuesta a MTF. En revisiones recientes se sigue incluyendo a ambos genes como relacionados con la respuesta a MTF (Froehlich et al. 2010; Polanczyk et al. 2010).

2.1.1.7. PROTEÍNA ASOCIADA AL SINAPTOSOMA 25 kDa (SNAP25)

Otro gen relativamente poco estudiado acerca de sus potenciales efectos sobre la respuesta a MTF es el que codifica para la proteína asociada al sinaptosoma (SNAP25), una proteína específica de neurona implicada en la exocitosis catecolaminérgica. En estudios previos se ha relacionado con la respuesta a antipsicóticos en el tratamiento de la esquizofrenia (Cheon et al. 2008, Muller et al. 2005).

McGough encontró asociación entre el alelo T en la posición 1065 (rs3746544) del gen y un mayor porcentaje de mejoría en los síntomas, mientras que aquéllos que eran homocigotos para el alelo T en la posición 1069 (rs1051312) mostraban peor respuesta (McGough et al. 2006). Más interesante, aquellos niños con genotipo 1069 G/G eran de dos a tres veces más susceptibles de desarrollar problemas de sueño e irritabilidad que sus contemporáneos con al menos una copia

del alelo T. Además, los pacientes 1069 C/C desarrollarían tics y otros movimientos anormales con una probabilidad de dos a cuatro veces mayor que aquéllos con el alelo T. Sin embargo, tres años después, este mismo investigador no encontró asociación entre este gen y la respuesta a MTF (McGough et al. 2009). Para resolver estas discrepancias varios autores han planteado nuevas estrategias para el futuro de los estudios de Farmacogenética, como usar protocolos estandarizados, utilizar tamaños muestrales más grandes y evaluar no sólo la mejora sintomatológica si no también la aparición de efectos secundarios (Froehlich et al. 2010; Kieling et al. 2010; Polanczyk et al. 2010).

2.1.1.8. LATROFILINA 3 (LPHN3)

La latrofilina 3 es un receptor acoplado a proteína G implicado en mecanismos de adhesión celular y transducción de señales y hasta la fecha solamente hay una publicación que señala a este gen como posible predictor de la respuesta a MTF, por lo que se requeriría confirmación de esta asociación en poblaciones independientes (Arcos-Burgos et al. 2010).

2.1.2. GENES ASOCIADOS CON RESPUESTA A ATOMOXETINA

2.1.2.1. CITOCROMO P450 (CYP450)

El complejo Citocromo P450 (CYP450) es una superfamilia de enzimas con complejos hememonóxido de carbono, con más de 25 isoenzimas humanas y cada una codificada por un gen diferente, divididas en cuatro familias y seis subfamilias. Su nombre se deriva de la absorbancia espectral máxima característica a 450 nm y es uno de los sistemas enzimáticos metabolizadores de fármacos más importantes del ser humano. Son hemoproteínas que promueven la eliminación de sustancias liposolubles al transformarlas en compuestos más polares para facilitar su excreción a través de la orina o la bilis (Lares-Asseff y Trujillo-Jiménez 2001). Los fármacos hidrosolubles se eliminan sin modificarse por la orina y permanecen poco tiempo en el organismo, sin embargo los fármacos liposolubles no son metabolizados tan fácilmente y permanecen durante más tiempo en el organismo.

2.1.2.1.1. ISOFORMA 2D6 (CYP2D6)

La isoforma 2D6 del citocromo P450 presenta uno de los ejemplos de variación farmacogenética en el metabolismo de fármacos mejor estudiado. El CYP2D6 metaboliza un 25-30% de los fármacos incluyendo: betabloqueantes, antiarrítmicos, antipsicóticos, antidepresivos y atomoxetina entre otros (Ingelman-Sundberg et al. 2007), lo que implica principalmente a los campos de la Psiquiatría, de la Oncología y de los trastornos cardiovasculares. El gen que codifica para esta isoenzima tiene el mayor número de variaciones genéticas (más de noventa) de entre todos los genes que codifican para isoenzimas del citocromo. Se expresa en distintos tejidos, aunque mayoritariamente en el hígado. No puede ser inducido y por lo tanto, la ingesta de inhibidores del CYP2D6 es el único factor ambiental que puede modificar de manera significativa su actividad (Cortés et al. 2007).

Centrándonos en su relación con el tratamiento del TDAH, es de gran relevancia su papel en la metabolización de la ATX. El CYP2D6 es el principal responsable de la formación de 4-hidroxiatomoxetina, el mayor metabolito activo de la ATX. Se ha visto que cuando la actividad de esta isoenzima está comprometida, múltiples de las otras isoformas son también capaces de formar este metabolito, pero con una eficiencia mucho menor (Ring et al. 2002).

Como se ha comentado anteriormente, existe un gran número de variantes alélicas en el CYP2D6. Esto hace que su actividad enzimática sea extremadamente variable. Fenotípicamente se definen cuatro niveles principales de actividad que se muestran todos ellos de forma esquemática en la Figura 10, donde se recoge la descripción a nivel de fenotipo, genotipo y la curva representativa de respuesta a dosis comunes.

- 1) Metabolizadores ultrarrápidos (UM).- tienen tres o más copias del gen activo, muestran una actividad enzimática elevada, lo que implicaría fallo terapéutico o falta de eficacia. La frecuencia de este fenotipo en población caucásica oscila entre el 1 y el 10%. Estudios recientes en población española indican que la frecuencia podría llegar a ser del 4,5% (Cortés et al. 2007).
- 2) Metabolizadores normales o extensivos (EM).- tienen dos copias funcionales del gen y presentan la actividad enzimática considerada como fisiológica para los fármacos que siguen esta vía de metabolización (Cortés et al. 2007).
- 3) Metabolizadores intermedios (IM).- son heterocigotos, con un alelo con actividad reducida y otro no funcional o bien homocigotos para alelos parcialmente funcionales. Los metabolizadores extensivos junto con los intermedios representan entre un 80 y un 94% de la población caucásica (Cortés et al. 2007).
- 4) Metabolizadores pobres o lentos (PM).- constituyen entre un 5 y un 10% de la población caucásica y se caracterizan por la pérdida de sus alelos funcionales o por ser portadores de alelos que codifican para unas enzimas con actividad muy disminuida. Estos individuos en general presentan un elevado riesgo de desarrollar reacciones adversas y toxicidad a los fármacos que son metabolizados por esta enzima (Cortés et al. 2007).

En el caso de la metabolización de la atomoxetina, se ha visto que los metabolizadores pobres muestran una mayor mejora sintomatológica que los metabolizadores extensivos, probablemente debido a las mayores concentraciones plasmáticas del fármaco y es probable que continúen con la terapia más que el resto de individuos (Stein y McGough 2008). Al mismo tiempo, también muestran tasas más altas de descenso de apetito, insomnio y variaciones en la presión sanguínea.

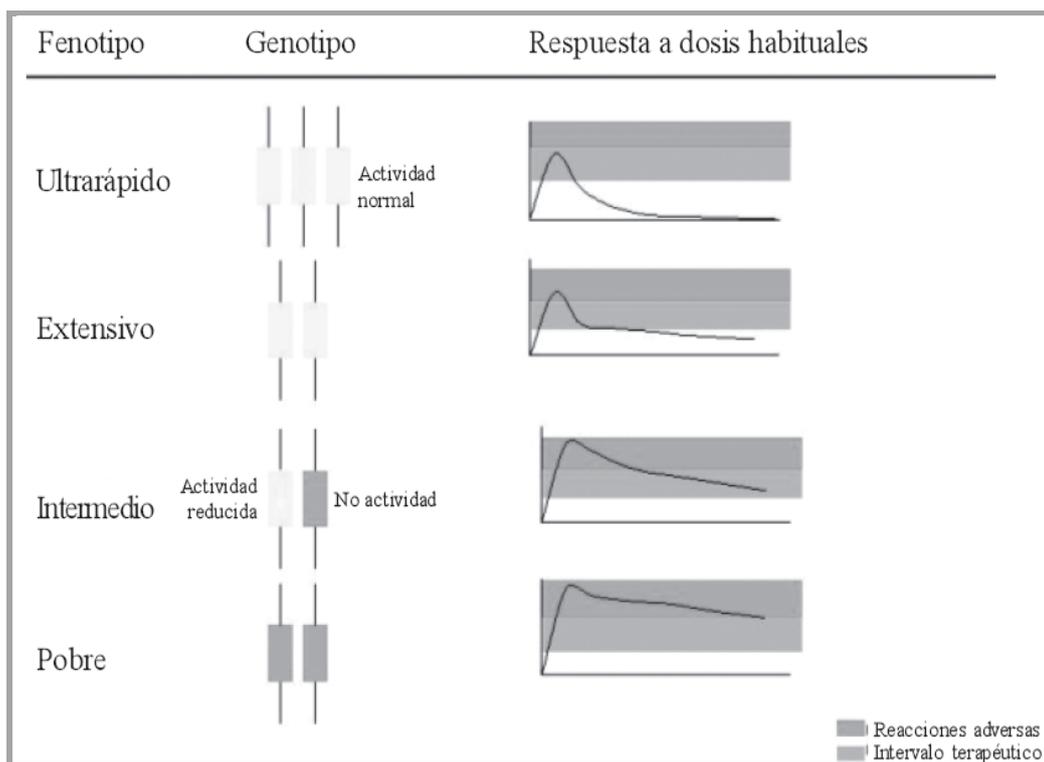


Figura 10.- Esquema de los cuatro niveles principales de actividad del citocromo CYP2D6. Se muestra la descripción fenotípica y genotípica para cada subtipo de metabolizador y la curva de respuesta típica de cada uno de ellos a las dosis habituales en clínica. Adaptado de Cortés et al. 2007.

2.1.2.2. TRANSPORTADOR DE DOPAMINA (DAT1)

En un estudio realizado con 16 niños, en el que midieron el SICI (*short interval cortical inhibition*) en la corteza motora, que se ha visto que está reducido en pacientes con TDAH, encontraron asociación con la VNTR de DAT1 y los efectos neurofisiológicos de la ATX (también del MTF) (Gilbert et al. 2006). Vieron que la ATX incrementaba la SICI en los individuos heterocigotos 9R/10R pero no en los homocigotos, lo que indicaría una peor respuesta al tratamiento. La población de estudio era muy pequeña, no hay ninguna otra referencia a esta posible asociación y sería sorprendente que un polimorfismo en DAT1 pueda modular los efectos de la ATX, pero sin duda de gran interés si se confirmara dicha asociación.

2.1.2.3. RECEPTOR DE DOPAMINA (DRD4)

Stein y McGough encontraron que los niños con al menos una copia del alelo 4R de la VNTR localizada en el exón mostraban una tendencia a una mejor respuesta a ATX (Stein y McGough 2008). Además, también muestran que en ausencia del alelo de 7R las puntuaciones en la subescala de hiperactividad del ADHD Rating Scale eran mejores. Sin embargo, no hay estudios que hayan replicado esta asociación, por lo que de momento y al igual que la asociación de DAT1, ha de entenderse como una futura línea de investigación en la Farmacogenética de la ATX y no como un hecho probado.

2.1.2.4. TRANSPORTADOR DE NORADRENALINA (NET1)

El transportador de NA NET1 también se ha estudiado por su posible asociación con la respuesta a ATX. Más concretamente, en el año 2009 se analizaron más de 100 SNPs de este gen encontrándose que 36 SNPs localizados en la región entre los exones 4 y 9 estaban asociados con la respuesta a ATX en dos poblaciones independientes de 160 y 105 niños con TDAH (Ramos et al. 2009). También fue genotipado el CYP2D6 pero no encontraron asociación. Sería una asociación de gran interés pero de momento es el único estudio que ha analizado la influencia de NET1 en la respuesta a ATX por lo que se requeriría que futuros estudios la confirmasen.

3. HERRAMIENTAS DE GENOTIPADO

Como se ha comentado anteriormente en el apartado de Genética del TDAH, conocer la secuencia de ciertas variantes genéticas en ciertos genes es de gran utilidad en el estudio y la comprensión del TDAH, ya que el factor genético de este trastorno está demostrado. Para poder obtener la secuencia de estos polimorfismos se utilizan las denominadas herramientas de genotipado. A continuación se van a detallar las que van a ser utilizadas en el desarrollo de este trabajo.

3.1. POLIMORFISMOS DE CAMBIO DE NUCLÉOTIDO (SNPs)

Con la secuenciación completa del genoma humano (Lander et al. 2001; Venter et al. 2001), se mostró que el genoma humano está compuesto por 3 billones de nucleótidos (A, T, C, G) de los cuales el 99,9% es idéntico entre dos individuos escogidos al azar. Sin embargo, también se revelaron un gran número de variantes genéticas, principalmente SNPs (polimorfismos de cambio de nucleótido). En agosto de 2009 hay publicados en la base de datos del **NCBI** (*National Center for Biotechnology Information*) más de 25 millones de SNPs en el genoma humano (25.003,333). Se estima que entre dos personas elegidas al azar existen unos 3 millones de SNPs diferentes entre ellas.

El análisis y estudio de estos SNPs además de ser de gran utilidad para trazar los orígenes humanos en estudios de tipo evolutivo, nos podría ayudar a comprender las diferencias existentes entre individuos en relación a presentar una predisposición/resistencia a ciertas enfermedades (haciendo la función de marcadores genéticos) o a presentar una buena/mala respuesta a ciertos fármacos, como ya se ha comentado anteriormente.

3.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (**PCR**) es una técnica de Biología molecular que fue descrita por primera vez en 1985 por Kary Mullis. Consiste en alternar unos ciclos de altas y bajas temperaturas para amplificar un fragmento de ADN. Coloquialmente se podría explicar como una “fotocopiadora molecular”. Para lograr dicha amplificación se sirve de la propiedad natural de las ADN polimerasas de replicar las hebras de ADN. Como se alternan altas y bajas temperaturas se utilizan ADN polimerasas termoestables obtenidas a partir de microorganismos adaptados a vivir a altas temperaturas como *Thermus aquaticus* (taq polimerasa). En la Figura 11 se muestra de forma esquemática el proceso completo que se da en una reacción de PCR, los pasos (1 a 4) se detallan a continuación.

La PCR básica consta de un primer paso de calentamiento hasta 94-95°C durante 5-10 minutos, en el cuál se activa la ADN polimerasa. Esto es en el caso de que sea una polimerasa hot-start que es la que se ha utilizado en este proyecto, ya que hay otras polimerasas que empiezan la reacción en cuanto la mezcla de los componentes anteriormente mencionados está completa.

Posteriormente tiene tres pasos (desnaturalización-hibridación-extensión) que se repiten entre 20 y 45 veces dependiendo de la cantidad de producto amplificado que se desee. Estos pasos son: 1) Desnaturalización de las hebras de DNA. 2) Unión del cebador a la hebra de DNA. 3) Extensión de la cadena en síntesis. Una vez completados todos los ciclos, se finaliza con dos últimos pasos, uno de extensión de la cadena a la temperatura óptima de la ADN polimerasa, normalmente 72°C, para finalizar enfriando la muestra a 4°C para su correcta conservación.

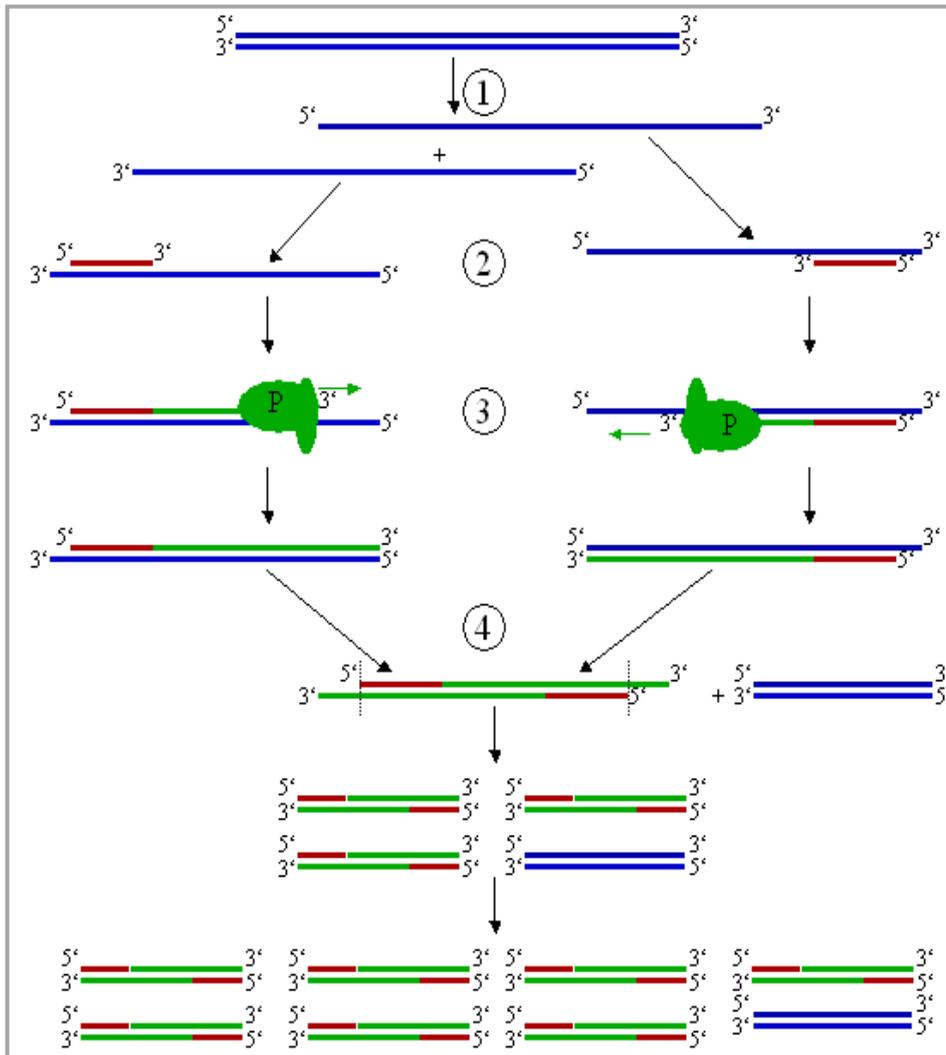


Figura 11.- Dibujo esquemático en el que se muestran los pasos que se dan en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar un fragmento de ADN.

3.3. CHIPS DE ADN

Un chip de ADN, también conocido como microarray, es una superficie sólida a la cual se unen una serie de fragmentos de ADN (oligonucleótidos) de forma ordenada, que hibridarán específicamente por complementariedad con la muestra de ADN de interés. Las superficies empleadas para fijar el ADN son muy diversas y pueden ser vidrio, plástico e incluso chips de silicio, también lo son las formas mediante las que se fijan los oligonucleótidos a la superficie y pueden ser procesos físicos o químicos. La detección de la hibridación se realiza mediante señal de fluorescencia. Actualmente ambos términos, microarrays y chips de DNA se utilizan indistintamente, sin embargo, existe una pequeña diferencia entre estos dos términos. Un array es una matriz. En el área de la informática un array almacena una lista ordenada de valores y en Biología almacena un grupo ordenado de moléculas de DNA sobre un soporte sólido. Sin embargo, el concepto de chip va un paso más allá, en informática un chip es un circuito integrado que puede computar gran cantidad de operaciones matemáticas en muy poco tiempo. En Biología hace referencia a un soporte de pequeño tamaño que contiene material biológico que se emplea para la obtención de información genética y permiten el análisis simultáneo de muchos genes. Se utilizan tanto para realizar estudios de expresión genética como de genotipado, aunque las características y procesamiento de las muestras difiere entre ambos tipos de chips.

En relación a las características técnicas, en el caso de los chips de genotipado, para cada polimorfismo de cambio de nucleótido, se depositan en la superficie sólida los oligonucleótidos complementarios tanto para el alelo normal o salvaje como para el menos frecuente o mutado. La intensidad de fluorescencia es proporcional a la hibridación y según con qué oligonucleótidos hibride la muestra se sabrá si se trata de un individuo homocigoto para el alelo salvaje (sólo hibridará con los oligonucleótidos correspondientes al alelo salvaje, con el directo y el reverso), o mutado (sólo hibridará con los dos correspondientes al mutado), o si se trata de un individuo heterocigoto (hibridará con los cuatro oligonucleótidos). En el apartado de metodología se describirán más profundamente estos aspectos.

Esta tecnología fue inicialmente desarrollada por Schena et al. (1995) para cuantificar la expresión diferencial de 45 genes en *Arabidopsis*. Actualmente ha avanzado mucho y como se ha comentado anteriormente, los chips se utilizan tanto para análisis de expresión como de genotipado y una de sus aplicaciones más interesante es la de detectar posibles variantes asociadas con la respuesta diferencial a fármacos (Cuyas et al. 2010). Los chips que actualmente se encuentran en el mercado para la detección de polimorfismos asociados con la respuesta a fármacos generalmente sólo incluyen polimorfismos de los citocromos P450, aunque algunos también abarcan enzimas relacionadas además de con el metabolismo con el transporte y las dianas farmacológicas (Cuyas et al. 2010). Actualmente no hay ningún chip de ADN ni ninguna técnica análoga que permita predecir la respuesta a los fármacos que se aplican para el tratamiento del TDAH específicamente.

3.4. TÉCNICAS DE ALTA CAPACIDAD DE GENOTIPADO

Se definen como técnicas de alta capacidad de genotipado a un grupo de técnicas de aparición reciente en la investigación genética que permiten el genotipado simultáneo de gran cantidad de polimorfismos y muestras diferentes a un coste asequible. A continuación se va a profundizar en dos de ellas, el Ensayo GoldenGate® y el Ensayo KASPar®.

3.4.1. ENSAYO GOLDENGATE®

La compañía de genotipado Illumina®, ha desarrollado el ensayo de genotipado GoldenGate®, que consiste en genotipar directamente a partir del ADN genómico. Ha sido utilizada durante el desarrollo del proyecto HapMap y es interesante destacar que mediante esta tecnología no es posible genotipar polismorfismos del tipo inserción/delección.

Todos los pasos que se van a describir a continuación se encuentran resumidos en la Figura 12 (Shen et al. 2005):

- 1) La muestra de ADN genómico se prepara para la hibridación mediante la unión con partículas paramagnéticas. Este paso se conoce como activación del ADN.
- 2) Posteriormente en el paso de hibridación se combinan los oligonucleótidos del ensayo, el tampón de hibridación y las partículas paramagnéticas con el ADN activado. Se diseñan tres oligonucleótidos para cada SNP a genotipar, de los cuales dos oligos son específicos para cada alelo del polimorfismo (**ASOs**; allele-specific oligos), y un tercer oligo que hibrida entre 1 y 20 bases hacia el extremo 3' del SNP, se le conoce como LSO (locus-specific oligo). Las tres secuencias contienen una secuencia de "amplificación universal", el **LSO** además contiene una secuencia única que se conoce como "address sequence" y que es complementaria a un tipo de "bola" (bead) particular. Los arrays de Illumina se constituyen del ensamblaje al azar de "bolas" dispuestas en sustratos de micropocillos. Cada tipo de bola tiene una secuencia de oligonucleótido única complementaria a la "address sequence" del LSO. De esta forma se pueden interrogar simultáneamente cerca de 1536 SNPs y cerca de 4600 oligos distintos pueden estar presentes en el tubo de reacción.
- 3) Le siguen varios pasos de lavado para reducir el ruido de fondo en el ensayo de genotipado. Los oligonucleótidos que han hibridado correctamente permanecerán unidos mientras que las hibridaciones inespecíficas y el exceso de oligonucleótidos será lavado.

- 4) Se añade una polimerasa con alta especificidad para el extremo 3' y solamente elonga los ASOs que encajen perfectamente con la secuencia diana en el SNP, se conoce como elongación alelo específica. Esta polimerasa no tiene actividad exonucleasa ni capacidad de desplazarse por la hebra, por lo tanto rellena solamente el espacio entre el ASO y el LSO, y cuando llega al LSO, se suelta. Tanto los ASO como el LSO tienen que hibridar en el mismo lugar diana, lo que asegura una alta especificidad.
- 5) Una DNA ligasa sella el espacio entre la secuencia elongada del ASO y del LSO para formar moldes de PCR que pueden ser amplificados con cebadores universales de PCR.
- 6) Se utilizan solamente 3 cebadores universales de PCR llamados P1, P2 y P3. Los cebadores P1 y P2 están marcados con Cy3 y Cy5 respectivamente, por lo que se generan productos de PCR marcados. Estos primers son los específicos para las secuencias de amplificación universal del alelo "normal" y "mutado", por ejemplo el P1 será el complementario para el ASO que ha hibridado con la A y el P2 con la G. El cebador P3 es el cebador reverso común para ambos.
- 7) Estos productos se hibridarán con su bola complementaria mediante la "address sequence", estas bolas se encuentran depositadas en el array (*Sentrix Array*).
- 8) Tras la hibridación se procede a la lectura de la señal de fluorescencia mediante el BeadArray Reader. Según las intensidades de las señales de cada SNP para la emisión del Cy3 o el Cy5 se generarán las nubes de los genotipos correspondientes.

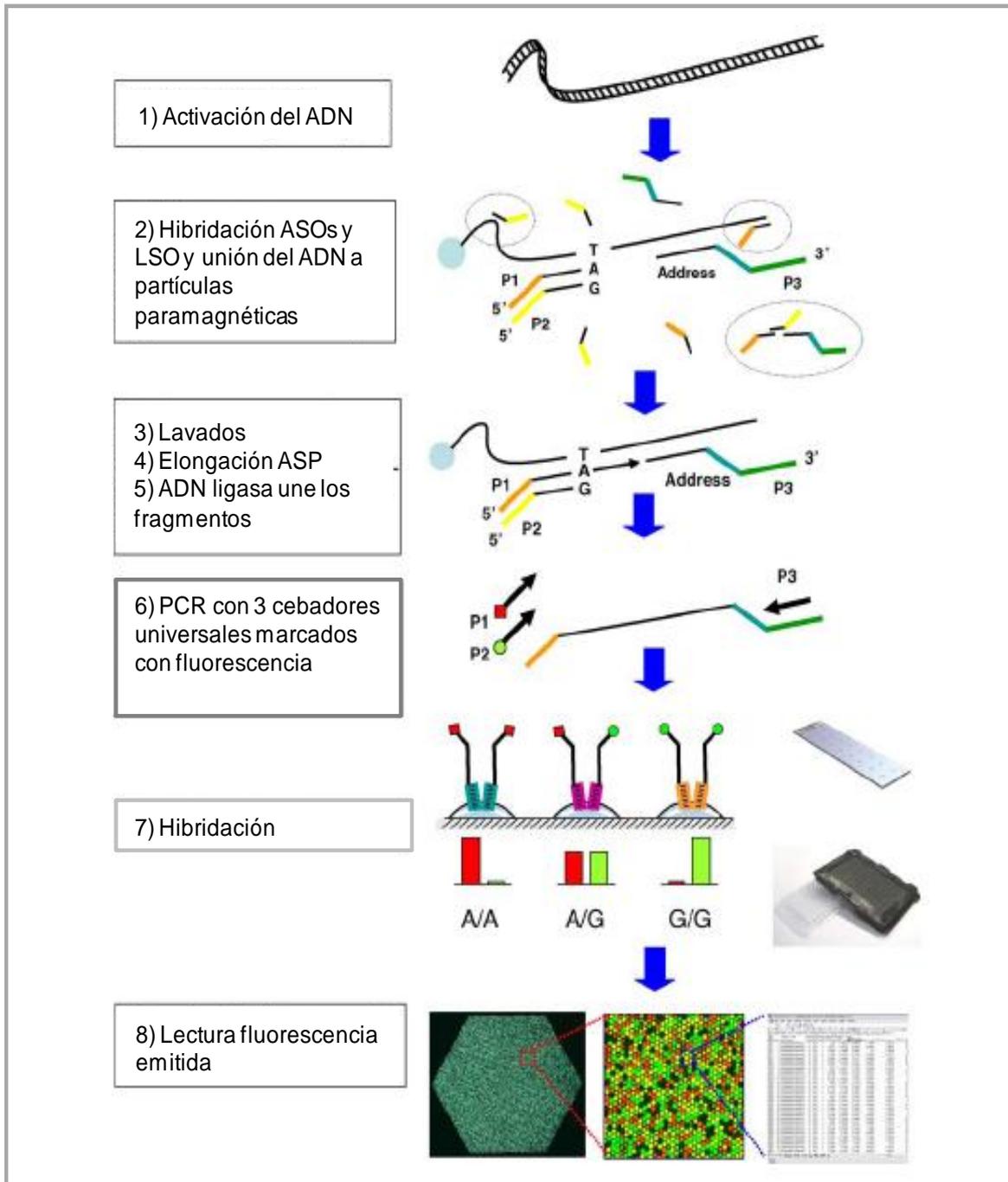


Figura 12.- Ilustración del ensayo de genotipado GoldenGate, se esquematizan todos los pasos que han sido descritos; 1) la activación del ADN, 2) Hibridación ASOs y LSO y unión del ADN a partículas paramagnéticas, 3) Lavados, 4) ADN polimerasa y elongación alelo específica (ASP), 5) ADN ligasa une los fragmentos, 6) Adición de 3 cebadores universales marcados y reacción de PCR, 7) Hibridación productos de PCR marcados con las bolas del array y finalmente 8) Lectura de la fluorescencia emitida. Adaptado de Shen et al. (2005).

3.4.2. GENOTIPADO MEDIANTE PCR COMPETITIVA (ENSAYO KASPar®)

El ensayo KASPar® es un sistema de genotipado por fluorescencia basado en una PCR alelo específica competitiva. Se utiliza una Taq polimerasa modificada que carece de actividad exonucleasa 3´-5´ y cebadores que generan productos de PCR fluorescentes, por lo que se puede genotipar el SNP en un único paso. Está diseñado como una **PCR multiplex** en la que en un único tubo de reacción se detectan ambos alelos. En la PCR se utilizan 5 cebadores diferentes:

- Tres cebadores específicos para el SNP de interés que están sin marcar, dos diferentes directos para cada una de las variantes del SNP y un cebador común reverso para ambos (Myakishev et al. 2001). Los cebadores directos tienen el nucleótido específico en el extremo 3´, mientras que en 5´ tienen una “cola” de 21 bases de longitud diferente entre ambos.
- Dos cebadores universales marcados con fluorescencia, cada uno de ellos tienen en el extremo 3´ una región idéntica a la cola de cada uno de los cebadores específicos mencionados en el párrafo anterior. En el extremo 5´ poseen un fluoróforo/emisor de energía (VIC o FAM) y un “quencher”/acceptor de energía. Cuando estos cebadores no se hallan unidos al ADN molde adoptan una estructura en horquilla en donde la molécula de fluoróforo se encuentra muy próxima al quencher, por lo que no se produce emisión de fluorescencia. Por el contrario, cuando son complementarios al ADN molde, la estructura de horquilla se rompe, el fluoróforo se separa del quencher y es capaz de emitir fluorescencia, ésta es detectada por un lector de placas modelo ABI7900HT (Myakishev et al. 2001).

Este fenómeno por el que cuando ambas moléculas se encuentran cerca se anula la emisión de fluorescencia se conoce con el nombre de FRET (Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia) también conocido como Transferencia Lineal de Energía y se produce solamente cuando existe muy poca distancia entre dos estados de excitación electrónica de dos moléculas fluorescentes en la que la longitud de onda de emisión de una de ellas coincide con la de excitación de la otra. Fue descrito por primera vez por Theodor Förster en 1914.

En la Figura 13 se muestra un esquema de los diferentes pasos de la PCR aleloespecífica competitiva que se utiliza en el sistema KASPar® de genotipado, poniendo como ejemplo un SNP A/G. En primer lugar los dos cebadores directos (uno específico para el alelo A en 3´ y otro para el alelo G también en 3´) junto con el cebador común reverso, sirven de molde para sintetizar un producto de PCR que tendrá la “cola” 1 o la “cola” 2 en el extremo 5´; en el caso de individuos heterocigotos, ambas colas estarán presentes. A continuación, los cebadores universales FRET (marcados con un fluoróforo) se unen, el marcado con el fluoróforo verde se unirá a la “cola” 1 (alelo A) y el rojo a la 2 (alelo G) y se sintetiza el fragmento, con la unión del

cebador reverso y la síntesis a partir de éste, la conformación de estos cebadores universales cambia, se rompe la estructura en horquilla y el fluoróforo queda libre para emitir fluorescencia roja, verde o ambas dependiendo de los fragmentos amplificados.

El resultado de este proceso es que uno de los homocigotos (el homocigoto normal por ejemplo) emitirá fluorescencia solamente en la longitud de onda del color verde, el otro homocigoto (en este caso el mutado) emitirá solamente en la longitud de onda del color rojo, mientras que los heterocigotos emitirán una mezcla de fluorescencia roja y verde (Myakishev et al. 2001).

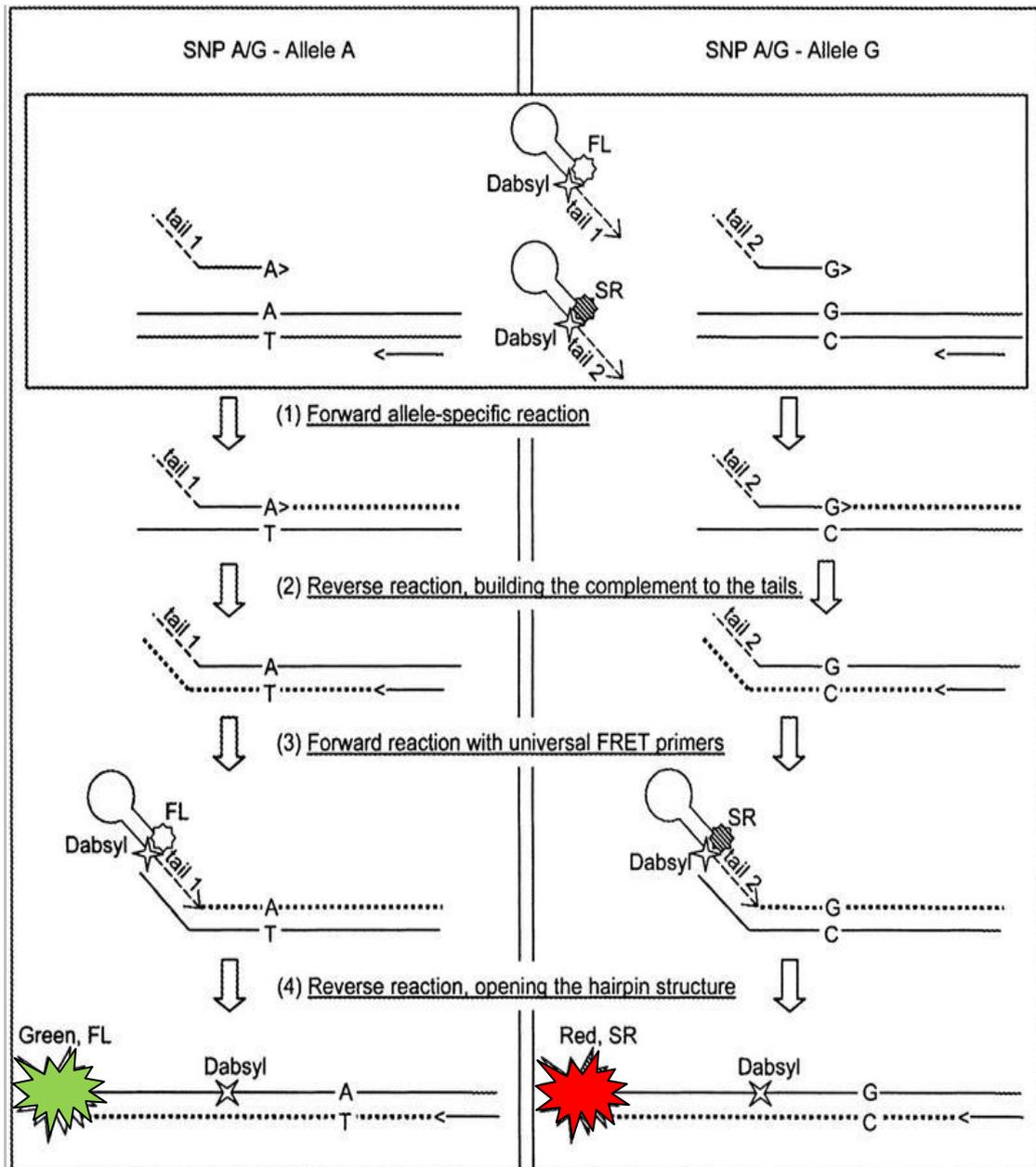


Figura 13.- Esquema que muestra los diferentes pasos de la reacción para la detección de un SNP A/G mediante el ensayo KASPar® (Myakishev et al. 2001).

II. OBJETIVOS

A pesar de que la eficacia de los tratamientos farmacológicos en el TDAH está demostrada en ensayos clínicos, un número significativo de pacientes abandona el tratamiento y hay una enorme variabilidad en la tolerancia y aceptación del mismo. Parte de esta variabilidad es debida a factores genéticos, aunque también podría deberse a la existencia de diferentes subgrupos dentro de la enfermedad, ya que los pacientes con TDAH forman un grupo muy heterogéneo en cuanto a la presencia e intensidad de las manifestaciones clínicas, siendo además frecuente la presencia de comorbilidades. Una dificultad añadida en el tratamiento de esta enfermedad es que el diagnóstico se basa en un examen de las características clínicas y del historial familiar del individuo, no existiendo ningún parámetro físico-químico cuantificable que facilite y asegure dicho diagnóstico. Tampoco se conoce ningún parámetro clínico o prueba analítica que permita predecir cuál va a ser la progresión del paciente a partir del momento del diagnóstico, ni si va a mostrar una buena o mala respuesta al tratamiento recibido.

Debido a la problemática existente para efectuar el diagnóstico y tratamiento óptimo de los pacientes con TDAH, se decidió hacer uso de dos de las áreas de la Medicina que más han crecido en los últimos tiempos, la Biología molecular y la Farmacogenética, para realizar este trabajo cuyo objetivo general fue:

Estudiar la asociación entre polimorfismos genéticos tanto con la variabilidad en la respuesta al tratamiento farmacológico del TDAH como con la heterogeneidad presente en el trastorno. Todo ello con la intención de desarrollar una herramienta de genotipado con un alto grado de sensibilidad y especificidad para mejorar el diagnóstico y la terapéutica del TDAH.

Para ello se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Búsqueda e identificación de polimorfismos genéticos (polimorfismos de cambio de nucleótido (SNPs)), inserciones/delecciones y repeticiones en tándem de número variable (VNTRs) que podrían estar asociados a TDAH, tanto en relación con la respuesta al tratamiento farmacológico, como al diagnóstico y a la evolución del trastorno.

Se realizó una exhaustiva búsqueda bibliográfica tanto de la neurobiología y de las bases moleculares del TDAH como de las asociaciones genéticas descritas. En base a la información obtenida y al objetivo establecido, se seleccionaron aquéllos polimorfismos que resultaron de interés.

2. Reclutamiento de pacientes con TDAH y controles para la obtención de muestras destinadas al estudio de polimorfismos.

Se establecieron colaboraciones clínicas con psiquiatras infantiles dedicados al diagnóstico y tratamiento del TDAH en el ámbito nacional. En colaboración con ellos, se establecieron los criterios de inclusión de pacientes y controles en el estudio. El objetivo para realizar el estudio de

asociación completo fue reclutar 400 muestras de saliva de pacientes de TDAH y 400 muestras de ADN de controles sanos sin enfermedades psiquiátricas diagnosticadas que se obtuvieron de bancos de ADN.

3. Desarrollo de un estudio piloto para estudiar la viabilidad del proyecto.

Este análisis preliminar se planteó como el diseño y desarrollo de un chip de genotipado por su potencial aplicación clínica. Se analizarían un número de muestras suficientes de pacientes con TDAH y los principales SNPs descritos en la literatura, para determinar si existían asociaciones significativas entre genotipo y fenotipo, de una forma más rápida, eficaz y económica.

4. Desarrollo del estudio completo de asociación genotipo-fenotipo y diseño de un algoritmo pronóstico del diagnóstico de TDAH y su tratamiento.

Para el estudio completo de asociación se seleccionaron las técnicas de alta capacidad de genotipado Ensayo Golden Gate[®] y KASPar[®], el kit PHARMAchip[®] v3.0, el analizador genético capilar y los geles de agarosa tradicionales. Todo ello debido al gran número de nuevos polimorfismos descritos, a la inclusión de inserciones/deleciones y VNTRs, a la necesidad de genotipar el gen CYP2D6 para la predicción de respuesta a atomoxetina y al número de muestras a genotipar (399 TDAH vs 400 controles).

Se seleccionaron las herramientas estadísticas óptimas entre las disponibles en la actualidad para analizar los resultados. El objetivo fue conjugar los datos clínicos de los pacientes con la información genética obtenida por las diferentes técnicas de genotipado. Posteriormente, se analizó si existían asociaciones estadísticamente significativas entre algún subgrupo con la intención de poder desarrollar un modelo de regresión que fuera capaz de clasificar adecuadamente a los pacientes para poder diagnosticarlos y elegir el tratamiento más adecuado en base a su perfil genético y características clínicas.

III. SUJETOS, MATERIALES Y MÉTODOS

1. SUJETOS PARTICIPANTES

1.1. CENTROS COLABORADORES

Para desarrollar los estudios de asociación entre los polimorfismos genéticos y las variables clínicas que se propusieron fue imprescindible el establecimiento de una red de colaboradores clínicos lo más amplia posible y con criterios uniformes de inclusión de pacientes en el estudio. Se buscaron los posibles centros colaboradores en el área de la Psiquiatría principalmente Infanto-Juvenil, aunque también de población adulta, tanto de centros públicos como privados, repartidos por toda la geografía española (Madrid, Barcelona, Navarra, Cádiz...). Todos ellos se muestran en la Tabla 6 junto con la relación de muestras aportadas por cada uno de ellos. Como puede observarse el mayor número de muestras ha sido aportado principalmente por 7 centros colaboradores. En la Tabla 6 también se muestran los bancos de ADN que aportaron las muestras de controles definidos como sanos (Salamanca y Euskadi).

Tabla 6 .- Tabla resumen de los centros colaboradores, mostrándose el número de muestras aportado por cada uno y el porcentaje sobre el total de muestras recogidas.

| Centro Colaborador | Nº Muestras | % |
|--|-------------|------------|
| Hosp. Univ. Ramón y Cajal (Madrid) | 75 | 16,5 |
| Hosp. Clín. Univ. De Zaragoza | 59 | 14,8 |
| Clín. Univ. De Navarra | 50 | 12,5 |
| Instituto Pere Mata (Tarragona) | 46 | 11,5 |
| Hosp. Univ. Puerta del Mar de Cádiz | 42 | 10,5 |
| Fundación Jiménez Díaz (Madrid) | 39 | 9,8 |
| Unidad Ambulatoria de Psiquiatría Badajoz | 31 | 7,8 |
| Hospital Sta María de Lleida | 18 | 4,5 |
| Unidad de Salud Mental Infantil Alicante | 11 | 2,8 |
| Hospital Universitario de Canarias | 11 | 2,8 |
| Clínica Avanza (Barcelona) | 8 | 2 |
| Hosp. De día Inf-Juv de Salud Mental de Pamplona | 5 | 1,3 |
| Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona | 4 | 1 |
| Total muestras pacientes TDAH | 399 | 100 |

| Centro Colaborador | Nº Muestras | % |
|---------------------------------------|-------------|------------|
| Banco de ADN de Euskadi (BIOEF) | 200 | 50 |
| Banco de ADN de Salamanca | 200 | 50 |
| Total muestras controles sanos | 400 | 400 |

1.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

De forma conjunta con los investigadores participantes en el estudio, se establecieron los criterios de inclusión que deberían cumplir tanto la población de TDAH como la de controles sanos sin enfermedades psiquiátricas.

1.2.1. PACIENTES CON TDAH

Los pacientes de TDAH para participar en el estudio debían cumplir los siguientes criterios de inclusión:

1. Origen caucásico.
2. Diagnóstico de TDAH realizado a partir de los 7 años (existen indicios de que antes de esta edad el TDAH puede ser confundido con otras patologías y el diagnóstico no sería preciso).
3. Seguimiento clínico de al menos 2 años para conocer el desarrollo de posibles comorbilidades y determinar su evolución.
4. Para el diagnóstico de TDAH y su seguimiento o evolución, se habrán utilizado los criterios definidos por el DSMIV-TR (2000), las escalas ADHDRS-IV (*ADHD-Rating scale IV*) autoaplicada en el caso de adultos y la escala de diagnóstico CRS-R (*Conners' Rating Scales-Revised*), para el diagnóstico de TDAH en niños. Ver Anexo I.
5. Consentimiento informado de participación en el estudio por escrito (firmado por el donante y/o por su tutor legal). Ver Anexo II.

1.2.2. CONTROLES SANOS

Los criterios de selección que se establecieron para las muestras consideradas como controles sanos fueron los siguientes:

- 1) Origen caucásico.
- 2) Sin antecedentes de enfermedades psiquiátricas o de abuso de drogas o de alcohol.
- 3) Mayoría de edad.
- 4) En una proporción 3:1 de varones y mujeres respectivamente, para asemejar las condiciones esperadas de las muestras de pacientes de TDAH.

1.3. MUESTRAS

1.3.1. TAMAÑO MUESTRAL

Para determinar el tamaño muestral necesario para la correcta consecución del proyecto se tuvo en cuenta el tipo de análisis estadístico que se llevaría a cabo con los resultados (regresión logística multivariante) y el número de polimorfismos que podrían entrar a formar parte de los modelos de regresión (algoritmo pronóstico).

Se estima que un modelo con 20 SNPs resulta significativo. Si cada SNP está asociado a dos variables (combinación heterocigoto+homocigoto normal vs homocigoto mutado y combinación heterocigoto+homocigoto mutado vs homocigoto normal), sumando un total de 40 variables (20SNPs x 2 variables/SNP). Teniendo en cuenta que el modelo de regresión logística precisa de al menos 15 sujetos por cada variable incluida, sería necesaria la inclusión de aproximadamente 600 individuos balanceados entre los grupos que se quieran comparar (40 variables x 15 sujetos/variable). Esto significaría que, en teoría serían necesarios unos 300 individuos de cada grupo a comparar en todas las variables a analizar (300 pacientes con TDAH y 300 controles, 300 pacientes con buena evolución y 300 con mala evolución, 300 pacientes con presencia de comorbilidades y 300 con ausencia de comorbilidad...).

A pesar de ello, debido a la dificultad de recolectar este tipo de muestras de pacientes de TDAH bien caracterizadas, se estableció el objetivo mínimo de reclutar una población de 400 pacientes, para tener el mayor número de muestras posibles en cada uno de los subgrupos de las diferentes variables a analizar aunque no se llegara a ese número ideal de 300 en cada comparación. Por tanto, para la variable de diagnóstico, se incluyeron también 400 controles sanos sin antecedentes de enfermedades psiquiátricas para que en el análisis de esta variable ambos grupos estuvieran balanceados.

Para el estudio piloto, como el objetivo era analizar las posibles asociaciones individuales para evaluar la continuidad del estudio, y no la elaboración de modelos de regresión logística, se estableció que un número de entre 250 y 270 muestras era suficiente (unos 130 individuos en cada grupo a comparar).

1.3.2. CONSIDERACIONES ÉTICAS

En relación a las consideraciones éticas, como en todo estudio científico realizado en humanos, se han seguido las recomendaciones de las guías de Buena Práctica Clínica en el alcance en que haya sido aplicable. El estudio se ha llevado a cabo siguiendo la legislación vigente sobre investigaciones clínicas con productos sanitarios y de acuerdo con las normativas éticas internacionales, siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki en su última versión. Se ha elaborado la documentación necesaria para la presentación y posterior aprobación del proyecto por los Comités de Ética de los distintos centros colaboradores. Del mismo modo, se han confeccionado los documentos de consentimiento informado para pacientes y/o tutores legales (Anexo II), cuadernos de recogida de datos (CRD) (Anexo I), protocolos de recolección y conservación de las muestras y protocolos de participación en el proyecto para los pacientes explicando claramente los requerimientos, riesgos y objetivos del mismo (Anexo II), documentos todos ellos imprescindibles para un estudio realizado con humanos y especialmente con niños.

El estudio sólo comenzó en cada centro colaborador tras haber obtenido por escrito la autorización del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) correspondiente. El CEIC sería informado si se introdujeran posibles cambios en el protocolo y aprobaría por escrito cualquier

cambio o desviación que pudiera aumentar las incomodidades hacia el sujeto y/o pudiera afectar negativamente los derechos del paciente o la validez de la investigación. Esta estipulación no se aplicó a aquellos cambios que se realizaran para reducir las molestias o evitar riesgos a los sujetos y a los cambios que afectaran a los aspectos administrativos del ensayo.

Todos los pacientes fueron informados por los clínicos de las características del estudio verbalmente y por escrito mediante la HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE y se les solicitó que firmaran un CONSENTIMIENTO INFORMADO (CI) antes de iniciar el estudio (en el caso de que fueran menores de edad en el momento de recogida de la muestra, lo firmaron sus tutores legales).

Respecto a la confidencialidad de los datos de los pacientes, cada investigador aseguró el mantenimiento del anonimato de sus pacientes. Tanto en los CRD como en otros documentos los pacientes son identificados por un código de identificación. El investigador guarda un registro de la inclusión de pacientes que muestre los códigos y nombres y se mantienen en estricta confidencialidad. Tienen acceso a los datos confidenciales de identificación de los sujetos el personal asignado al estudio, el monitor designado por el promotor y los representantes de las autoridades sanitarias competentes. Las historias clínicas de los sujetos participantes, así como toda la documentación perteneciente al estudio que deba ser conservada en el archivo del estudio por el investigador, serán custodiadas durante el período de tiempo establecido por la legislación local en un archivo bajo llave, reflejando cualquier traspaso o eliminación de los mismos. Este almacenamiento será custodiado por el investigador en cada uno de los centros colaboradores participantes.

El tratamiento, la comunicación y la cesión de datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustan a lo dispuesto en la Ley de Protección de Datos (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre) y el paciente puede ejercer el derecho de modificación, oposición y cancelación de datos cuando lo estime oportuno.

1.3.3. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE PACIENTES DE TDAH

En relación a la metodología de recolección de las muestras de pacientes de TDAH, se decidió que se trataría de muestras de saliva, ya que se trata de un método no invasivo que permite reducir los posibles problemas éticos que podrían surgir al tratarse de un estudio en población infanto-juvenil principalmente y facilitar la obtención de las muestras.

El proceso de recolección de muestras se desarrolló en una única visita en la que los pacientes fueron evaluados en los Servicios de Psiquiatría de los centros de investigación que participaron en este estudio. Cuando un paciente que acudía a una consulta rutinaria de seguimiento de su trastorno y cumplía con los criterios de inclusión del proyecto, el investigador procedía a explicarle el proyecto, solicitarle su participación en el mismo y requerirle la firma del

CI (el paciente o su tutor legal) (Anexo II). A continuación, el investigador procedió a pasarle el Test ADHD Rating Scale version autoaplicada para el paciente mayor de edad o la versión para padres en el caso de niños. El clínico procedió además a rellenar la escala de Impresión clínica Global (ICG) y a anotar los resultados y las características clínicas requeridas en el CRD. Como puede observarse en el Anexo I, si se disponía de datos de otras escalas utilizadas en el momento del diagnóstico recogidas en la historia clínica, también fueron anotadas, si no se disponía de esta información, se pidió al paciente/tutor legal que cumplimentara la misma escala de forma retrospectiva. Finalmente se solicitaba al paciente una muestra de saliva que almacenaba y, una vez a la semana, se enviaba junto con el resto de muestras recogidas, a Progenika Biopharma S.A, donde se procedía a su análisis.

Se establecieron los saliveros Oragene[®] ADN/saliva cuya capacidad máxima es de unos 4 ml (en la Figura 14 se muestra uno de estos saliveros) como el medio óptimo para la recolección de las muestras de saliva de los pacientes participantes en el estudio. La estabilidad de las muestras una vez recolectadas y cerrado el salivero es de hasta 1 año a temperatura ambiente aunque en ningún caso se superó este tiempo de almacenamiento.



Figura 14.- Fotografía de un salivero Oragene[®] ADN/saliva cerrado y abierto como los que se han utilizado para la recolección de las muestras de pacientes de TDAH para el desarrollo de este estudio de asociación. En la tapa se observa una fina película de plástico que se rompe al cerrar el salivero, liberándose la solución preservadora del ADN y comenzando el proceso de extracción.

En todo el estudio se recogieron un total de 399 muestras de pacientes de TDAH, estas muestras se utilizaron en el estudio completo de asociación. Su perfil en cuanto a sexo y subtipo de TDAH se ajustaba a la prevalencia descrita en la bibliografía como se muestra en la Figura 15, por lo que se trata de una población representativa de la población general de pacientes de TDAH. En esta figura se muestra además la distribución de edades de las muestras recolectadas. Las edades de los pacientes están comprendidas entre los 4-47 años (siendo la mediana 13 años). En primer lugar se planteó un estudio en población infanto-juvenil como se ha descrito anteriormente, sin embargo, al contactar con psiquiatras que trataban a pacientes de TDAH predominantemente adultos y como el material genético no cambia a lo largo de los años, se decidió incluir también en el estudio a aquellos pacientes adultos que estuvieran

perfectamente caracterizados y que cumplieran los criterios de inclusión establecidos. A pesar de que 34 de los 399 pacientes no cumplían el criterio de inclusión de diagnóstico realizado a partir de los 7 años, se solicitó la revisión de la inclusión de estos casos a los clínicos que habían enviado las muestras, y éstos confirmaron su diagnóstico de TDAH y mostraron gran interés en que fueran incluidas en el estudio. Una descripción más detallada de estas muestras se encuentra en el Anexo III parte A, donde se detalla el código de cada muestra, la edad en el momento de la recolección, el periodo de evolución, el sexo, el subtipo de TDAH y el tratamiento farmacológico actual.

Con las primeras 274 muestras de pacientes de TDAH recogidas se realizó el estudio piloto de asociación tal y como se describe en el apartado 4.

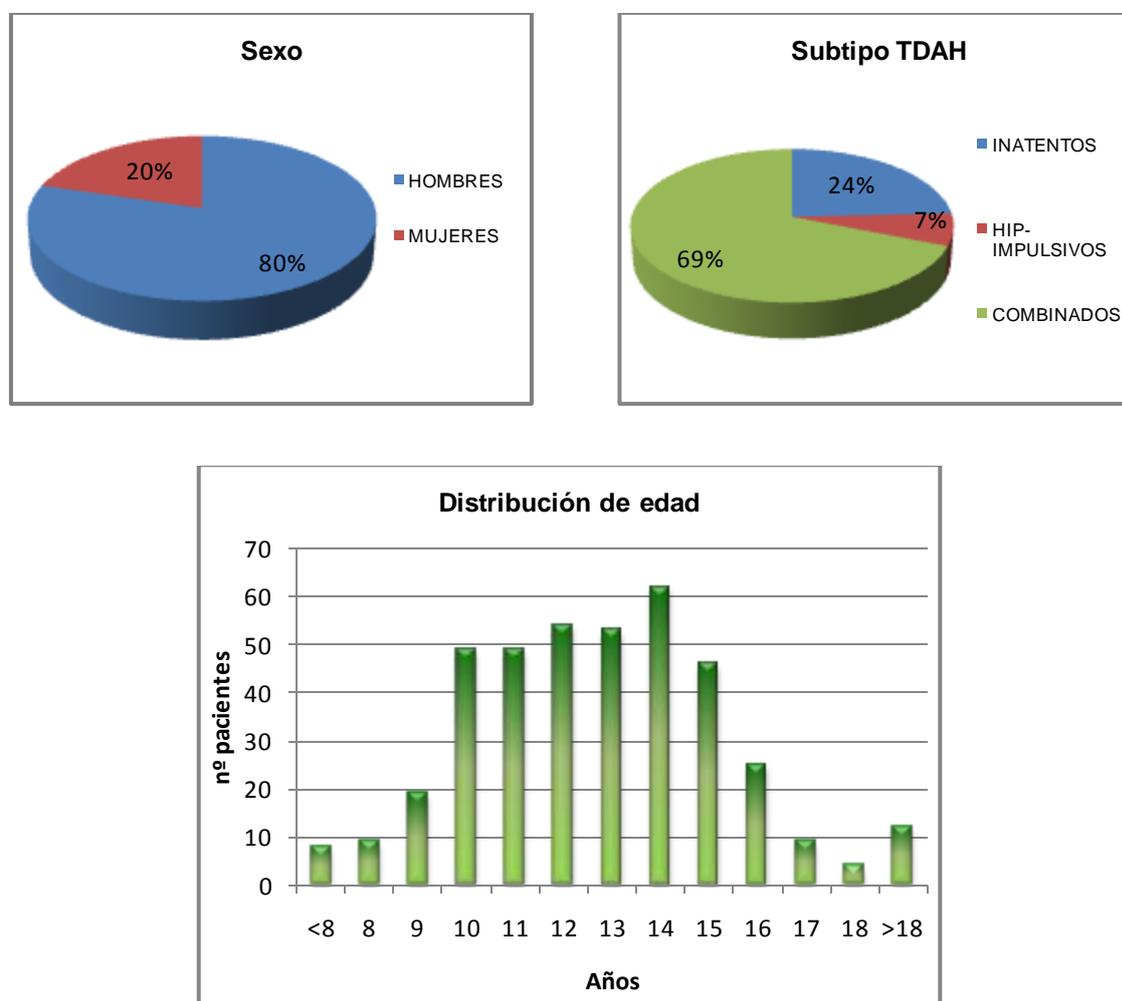


Figura 15.- Gráficas descriptivas de las características de sexo, edad y subtipo de TDAH para las 399 muestras de pacientes de TDAH reclutadas. Se observa cómo las distribuciones de sexo y subtipo de TDAH se ajustan perfectamente a los valores descritos en la bibliografía en relación a la prevalencia del TDAH: 80% varones (azul), 20% mujeres (rojo) y 69% subtipo combinado (verde), 24% subtipo inatento (azul) y 7% subtipo hiperactivo-impulsivo (rojo) (Valdizan y Izaguerri-Gracia 2009).

1.3.4. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE CONTROLES SANOS

Se estableció el objetivo de reclutar un total de 400 muestras de controles sanos sin enfermedades psiquiátricas para que este grupo estuviera balanceado con el de pacientes de TDAH. Estas muestras fueron recolectadas para la parte del estudio completo que pretende analizar una posible asociación entre los polimorfismos genéticos y el diagnóstico de TDAH. Estas 400 muestras se obtuvieron de dos bancos de ADN diferentes (para aumentar la variabilidad geográfica del origen de estas muestras) y su origen fue el siguiente: 200 muestras del banco de ADN de Salamanca y 200 muestras del banco de ADN de Euskadi (BIOEF). Ambos centros nos facilitaron los datos de sexo y edad de cada una de las muestras, estos datos se encuentran recogidos en el Anexo III parte B. Todas las muestras de controles sanos fueron proporcionadas en forma de ADN ya extraído, cumpliendo con todos los requerimientos legales.

Las muestras de controles sanos que se solicitaron cumplieron los requerimientos especificados en el apartado 1.2.2. Uno de estos requerimientos fue que no poseyeran antecedentes de enfermedades psiquiátricas, este hecho fue corroborado por los centros colaboradores, pero en ningún caso se utilizaron escalas diagnósticas para descartar este tipo de trastornos. Por ello, se asume que, a pesar de ser controles teóricamente sanos, podría suceder que, en una probabilidad muy baja, se haya incluido a algún individuo con alguna enfermedad psiquiátrica no diagnosticada, incluso con TDAH.

1.3.5. EXTRACCIÓN DEL ADN

El ADN genómico de las muestras de pacientes de TDAH se extrajo a partir de las muestras de saliva recolectadas, siguiendo el protocolo de extracción que proporciona el proveedor de saliveros Oragene[®] ADN/saliva (ADN Genotek).

Este método consiste en lisar las células y precipitar el ADN. El proceso comienza en cuanto el salivero se cierra, ya que se libera una solución (Oragene DNA solution[®]) que comienza la lisis celular y al mismo tiempo preserva el ADN que se libera. Cuando se recibe el salivero con la muestra, tras agitarlo por inversión durante unos segundos (para asegurar que saliva y solución se mezclan adecuadamente), se separa una alícuota de 500 µl para purificar y extraer el ADN. La saliva restante puede ser almacenada indefinidamente entre -15 y -20°C y puede sufrir múltiples ciclos de congelación y descongelación sin sufrir deterioro. La alícuota de 500 µl se incubaba a 50°C durante una hora en el termobloque para continuar la lisis celular, se añade la solución Oragene ADN Purifier[®] y se incubaba en hielo unos 10 minutos; después se centrifuga para eliminar las impurezas y se precipita el ADN con etanol previo a una nueva centrifugación. A continuación, se retira completamente el etanol, ya que si quedan residuos, éste puede interferir con la reacción de PCR y dificultar la amplificación, y se resuspende el ADN en agua miliQ autoclavada. Finalmente, se cuantifica la cantidad de ADN obtenida y se comprueba que la pureza sea la adecuada, mediante las relaciones de absorbancia 230/260 (debe ser mayor de 1) y 260/280 (debe situarse entre 1,8 y 2).

1.3.6. ELABORACIÓN BASE DE DATOS CLÍNICOS

Se elaboró una base de datos clínicos electrónica con toda la información recogida en los CRDs. A partir de esta base de datos posteriormente se seleccionaron los datos correspondientes a las variables de estudio y se conjugaron con los resultados obtenidos del genotipado de las muestras para realizar el análisis estadístico de forma conjunta. En el caso del estudio piloto, con los resultados del chip de genotipado y en el estudio completo, con los resultados de los cuatro métodos utilizados, ensayo GoldenGate[®], ensayo KASPar[®], PHARMAchip[®] y **kit de reordenamientos**.

En el Anexo I se muestra un CRD de los empleados en este estudio, en él puede observarse la información que recopila:

1. Investigador que incluye al paciente en el estudio.
2. Fecha de nacimiento y sexo.
3. Acerca del diagnóstico: fecha del diagnóstico, subtipo de TDAH, puntuación obtenida en los test diagnósticos y puntuación obtenida en la Escala de Impresión Clínica Global (ICG), en el caso de que se posean estos datos en el momento del diagnóstico.
4. Presencia de antecedentes asociados a TDAH del tipo: familiares (maltrato, disgregación familiar...), sociales (abuso de sustancias, exclusión social...), escolares (fracaso, expulsión...) u otro tipo de antecedentes.
5. Número y características de los tratamientos recibidos desde el momento del diagnóstico.
6. Puntuaciones obtenidas en el Test ADHD Rating-Scale-IV-versión del padre o en la versión autoaplicada, así como la puntuación obtenida en la Escala de Impresión Clínica Global en el momento de recolección de la muestra y de entrada de participación en el proyecto y en el momento del diagnóstico.
7. Presencia y tipo de comorbilidades
8. Cualquier otra información que el clínico considere relevante sobre el estado o el ambiente del paciente y que pudiera resultar relevante para el análisis de los resultados del estudio (por ejemplo si hay sospecha de abandono de tratamiento o si el clínico considera que presenta una buena evolución a pesar de la puntuación de los padres, si se presentaron determinados efectos secundarios, coeficiente intelectual...).

Se revisaron todos los CRDs recogidos mediante monitorizaciones periódicas realizadas a los distintos centros colaboradores durante el periodo de recogida de muestras y se comprobó que los pacientes cumplieran criterios de inclusión y que se hubieran rellenado todos los campos. En el caso de que existieran valores perdidos, se contactó con cada uno de los clínicos para intentar completar dichos valores.

2. MATERIALES UTILIZADOS

En este apartado se detalla el conjunto de reactivos, materiales, equipo de laboratorio, programas informáticos y páginas web que han sido utilizados en el desarrollo de este trabajo. Se muestran todos ellos en las Tablas 7-11. Además de todo esto, para el desarrollo del chip de genotipado en el estudio piloto se ha utilizado la colección de ADN de la población general propiedad de Progenika Biopharma S.A.

Tabla 7.- Tabla que recoge todos los reactivos que se han utilizado en el desarrollo de este trabajo. En la columna de la derecha se muestra la empresa que comercializa cada uno de los reactivos descritos.

| Reactivo | Casa comercial |
|--|---------------------------------------|
| Buffer de carga 10X Blue Juice™ Gel Loading Buffer | Invitrogen Life Technologies (EE.UU.) |
| 1 Kb DNA Ladder | Invitrogen Life Technologies (EE.UU.) |
| 5X Tdt buffer | Roche Diagnostics S.L. (España) |
| ABI PRISM® Primer Pairs (FAM, NED, PET y VIC) | Applied Biosystem® (EE.UU.) |
| Agarosa Low EEO de uso rutinario | Sigma Aldrich® (EE.UU.) |
| Agua libre de nucleasas | Qiagen (Alemania) |
| Biotina-11-ddUTP | NEN Life Science Inc (EE.UU.) |
| Bromuro de etidio 10 mg/ml | Invitrogen Life Technologies (EE.UU.) |
| ChipHybe | Ventana Medical Systems Inc (EE.UU.) |
| Cloruro de cobalto (CoCl ₂) | Roche Diagnostics S.L. (España) |
| Dimetilsulfóxido (DMSO >99%) | Sigma Aldrich® (EE.UU.) |
| DNA polimerasa Amplitaq® Gold | Applied Biosystem® (EE.UU.) |
| DNAsa (1U/μl) | Promega Biotech Ibérica (España) |
| dNTP Mix | Applied Biosystem® (EE.UU.) |
| Dodecilsulfato sódico (SDS 10%) | Invitrogen Life Technologies (EE.UU.) |
| EDTA 20mM | Invitrogen Life Technologies (EE.UU.) |
| Etanol (>99.5%) | Sigma Aldrich® (EE.UU.) |
| Fluoróforo Cy3 | Amersham Biosciences (U.K.) |
| Formamida deionizada (HiDi® Formamide) | Applied Biosystem® (EE.UU.) |
| Fosfatasa alcalina (1U/μl) | Roche Diagnostics S.L. (España) |
| GeneAmp 10X PCR Buffer II | Applied Biosystem® (EE.UU.) |
| GenomiPhi V2 Amplification Kit | GE Healthcare (U.K.) |
| Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing® | Applied Biosystem® (EE.UU.) |

| Reactivo | Casa comercial |
|--|---------------------------------------|
| Marcador de peso molecular GeneScan 500 ROX | Applied Biosystem® (EE.UU.) |
| Cloruro de Magnesio (MgCl ₂) 25 mM | Applied Biosystem® (EE.UU.) |
| Oligonucleótidos | Invitrogen Life Technologies (EE.UU.) |
| Phamachip® v3.0 kit | Progenika Biopharma S.A. (España) |
| QIAGEN Multiplex PCR Kit | Qiagen® (Alemania) |
| Reactivos hibridación | Ventana Medical Systems Inc (EE.UU.) |
| Seroalbúmina bovina (BSA, liofilizado >96%) | Sigma Aldrich® (EE.UU.) |
| Tampón TAE (Tris-acetato-EDTA) | Sigma Aldrich® (EE.UU.) |
| Transferasa terminal (Tdt) (400U/μl) | Roche Diagnostics S.L. (España) |

Tabla 8.- Tabla que recoge todos los materiales de laboratorio que se han utilizado en el desarrollo de este trabajo. En la columna de la derecha se muestra la empresa que comercializa cada uno de los materiales descritos.

| Material | Casa comercial |
|--|--|
| Microamp® TM Optical film compression pack | Applied Biosystem® (EE.UU.) |
| Placas 384 pocillos modelo microtiter NUNC® | Thermo Fisher Scientific Inc. (EE.UU.) |
| Placas 96 pocillos para termociclador: Microamp® Optical 96 well reaction plates | Applied Biosystem® (EE.UU.) |
| Puntas con filtro (NEPTUNE);BT10, BT20, BT100 y BT1000 | Continental Lab Products (EE.UU.) |
| Puntas sin filtro; Finntip 10, Finntip 200 y Finntip 1000 | Labsystems S.A. (Argentina) |
| Saliveros Oragene® ADN/saliva | DNA Genotek (Canada) |
| Tubos 1,5ml libres de PCR: MicroTest Tubes 3810x | Eppendorf ibérica (España) |

Tabla 9.- Tabla que recoge todos los equipos que se han utilizado en el desarrollo de este trabajo, en la columna de la derecha se muestra la empresa que comercializa cada uno de los equipos descritos.

| Equipo | Casa comercial |
|--|--|
| ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer | Applied Biosystem® (EE.UU.) |
| Balanza de laboratorio, PCE-LSM 2000 | PCE group Ibérica S.L. (España) |
| Centrífuga de placas, Centrifuge 5804 | Eppendorf ibérica (España) |
| Cubeta de electroforesis, Sistema MultiCaster Aqua Gel | EmbiTec (EE.UU.) |
| Escáner fluorescente confocal modelo InnoScan® 700 | Innopsis (Francia) |
| Estación automática de hibridación Ventana Discovery | Ventana Medical Systems Inc. (EE.UU.) |
| Fluorímetro, Qubit™ Fluorometer | Invitrogen Life Technologies (EE.UU.) |
| Fuente de alimentación de electroforesis RunOne | EmbiTec (EE.UU.) |
| Microcentrífuga no refrigerada, Biofuge pico | Heraeus (Alemania) |
| Robot MicroGrid 610 BioRobotics | Genomic Solutions Ltd (U.K.) |
| Robots Modelos Nanoprint 210 y 60 | Arrayit (EE.UU.) |
| Nanodrop 1000 Spectrophotometer | Thermo Fisher Scientific Inc. (EE.UU.) |
| Pipetas P-1000, P-200, P-20, P-10 | Gilson, Inc (EE.UU.) |
| Termociclador Gene Amp PCR System 9700 | Applied Biosystem® (EE.UU.) |
| Transiluminador High performance UV | UVP® (EE.UU.) |
| Vortex modelo Zx3 | Velp Scientifica srl (Italia) |

Tabla 10.- Tabla que recoge todos los programas informáticos que se han utilizado en el desarrollo de este trabajo. En la columna de la derecha se muestra la empresa que comercializa cada uno de los programas descritos.

| Programa | Casa comercial |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| GenCall | Illumina (EE.UU.) |
| HelixTree v.4.4.2. | Golden Helix, Inc. (EE.UU.) |
| MAPIX | Innopsis (Francia) |
| OligoDesigner® | Illumina (EE.UU.) |
| Peak Scanner Software v1.0 | Applied Biosystem® (EE.UU.) |
| SNPviewer software (versión 1.93) | Kbiosciences (UK) |
| Software PHARMAchip v.3 | Progenika Biopharma S.A. (España) |
| SPSS v11.0 | SPSS Inc. (EE.UU.) |

Tabla 11.- Tabla que recoge las direcciones de las principales páginas web que se han utilizado en el desarrollo de este trabajo. En la columna de la derecha se muestra el nombre del sitio de internet al que hacen referencia dichas direcciones.

| Nombre del sitio | Dirección |
|--|---|
| Biocarta | http://biocarta.com |
| The restriction enzyme database | http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html |
| GeneCards | http://bioinfo.weizmann.ac.il/cards-bin/ |
| SNPs 3D | http://www.snps3d.org/ |
| SNPper (Chip Bioinformatics Tools) | http://snpper.chip.org/bio/snpper-enter-gene |
| Genetic Association Database | http://geneticassociationdb.nih.gov/cgi-bin/index.cgi |
| CNIO Bioinformatics Unit | http://bioinfo.cnio.es/SNP/ |
| FastSNP Search | http://fastsnp.ibms.sinica.edu.tw/pages/input_CandidateGeneSearch.jsp |
| BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) | http://130.14.29.110/BLAST/ |
| Gene Entrez NCBI | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez |
| Human Gene Mutation Database | http://www.hgmd.cf.ac.uk |
| Vademecum | http://www.vademecum.es |
| CYP2D6 alleles | http://www.imm.ki.se/cypalleles |
| Illumina | http://www.illumina.com/ |
| Kbiosciences | http://www.kbioscience.co.uk/ |
| US National Library of Medicine | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed |
| HapMap Project | http://www.hapmap.org |
| Primer Picker (Kbiosciences) | http://www.kbioscience.co.uk/software/lims/lims_help/pp.ui.dialog.htm |
| Primer3 v0.4.0. Whitehead Institute for Biomedical Research, EE.UU | http://frodo.wi.mit.edu/primer3/ |
| UCSC Genome Bioinformatics Site | http://genome.ucsc.edu/ |
| OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim |
| Reverse Complementary | http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html |

3. TIPO DE ESTUDIO

Este trabajo presenta un estudio descriptivo, observacional, de corte transversal, cuyo objetivo final es el de poder apoyar el diagnóstico de TDAH, predecir la evolución y la respuesta a tratamiento farmacológico en pacientes diagnosticados *de novo* como TDAH, mediante un análisis de asociación entre genotipo y fenotipo. Para tal fin se planteó un estudio clínico multicéntrico en población principalmente infanto-juvenil de origen español (población caucásica).

Debido a la problemática existente actualmente en relación al diagnóstico, tratamiento y evolución de los pacientes de TDAH, como se han descrito en el apartado de introducción, se plantearon las siguientes preguntas:

- 1) ¿Existe una asociación entre ciertos polimorfismos genéticos y un mayor riesgo de padecer TDAH?
- 2) ¿Existe una asociación entre ciertos polimorfismos genéticos y determinados fenotipos asociados a TDAH que influyen en la diferente evolución de los pacientes?
- 3) ¿Existe una asociación entre ciertos polimorfismos genéticos y la respuesta al tratamiento farmacológico que se aplica actualmente en el TDAH?
- 4) ¿Se podría utilizar estas asociaciones genéticas junto con las características clínicas para elaborar un modelo de regresión que sea capaz de clasificar adecuadamente a los pacientes para poder confirmar el diagnóstico y tratarles de forma personalizada? ¿Se podría desarrollar una herramienta de genotipado para ello?

Para responder a estas preguntas de la forma más eficaz posible, se organizaron dos tipos de estudios de asociación:

- a) Un primer estudio piloto mediante el que se pretendía sondear de una forma económica la viabilidad del estudio completo. Este análisis preliminar se plantó como el desarrollo de un chip de genotipado en el que se incluirían los SNPs que se consideraran necesarios tras una búsqueda bibliográfica y se analizarían un número de muestras suficientes de pacientes de TDAH para determinar si existían asociaciones significativas entre ciertos SNPs identificados en la bibliografía y determinados fenotipos asociados a TDAH que influyen en la diferente evolución de los pacientes (buena/mala evolución, presencia/ausencia de comorbilidades, subtipo TDAH...). Estos SNPs podrían aplicarse como predictores del pronóstico del trastorno. El desarrollo del chip de genotipado se realizaría de forma paralela a la recolección de muestras con ADNs de la población general (Progenika Biopharma S.A.) y cuando se obtuviera el número

suficiente se realizaría el estudio de asociación propiamente dicho. El período de tiempo aproximado para este estudio fue de 2 años desde que se inició la búsqueda bibliográfica hasta obtener los resultados de asociación. De esta forma, además de los resultados obtenidos, se disponía de una potencial herramienta de genotipado de aplicación comercial en el área del TDAH.

- b) Posteriormente, ya que resultados de asociación positivos del estudio piloto así lo recomendaron, se inició el que se denominará **estudio completo** con diseño caso-control. Durante el periodo de la recolección de la totalidad de las muestras de pacientes de TDAH y elaboración del estudio piloto, surgieron un gran número de publicaciones de nuevas asociaciones genéticas con el TDAH y con la respuesta a tratamiento farmacológico, ya que como se muestra en la Figura 16, el crecimiento de publicaciones en este campo es exponencial. Por ello, se realizó una actualización bibliográfica y se incluyeron nuevos SNPs y genes de interés. Se decidió también incluir muestras de controles sanos sin enfermedades psiquiátricas conocidas con la intención de dar a la herramienta una posible aplicación diagnóstica además de pronóstica. Debido al gran número de SNPs descritos en este periodo de tiempo y al aumento en el número de muestras a genotipar fue necesario recurrir a las herramientas de alta capacidad de genotipado descritas en el apartado de Introducción (GoldenGate[®] y Ensayo KASPar[®]). Del mismo modo, la relevancia de la inclusión de inserciones/delecciones y VNTRs hizo necesaria la puesta a punto de un método de genotipado de este tipo de polimorfismos. Finalmente, se consideró de gran relevancia el genotipado del gen CYP2D6 para la predicción de respuesta a atomoxetina y se seleccionó el kit PHARMAchip[®] v3.0 para ello. Finalmente, se realizó el análisis de regresión logística multivariante con todas las variables seleccionadas.

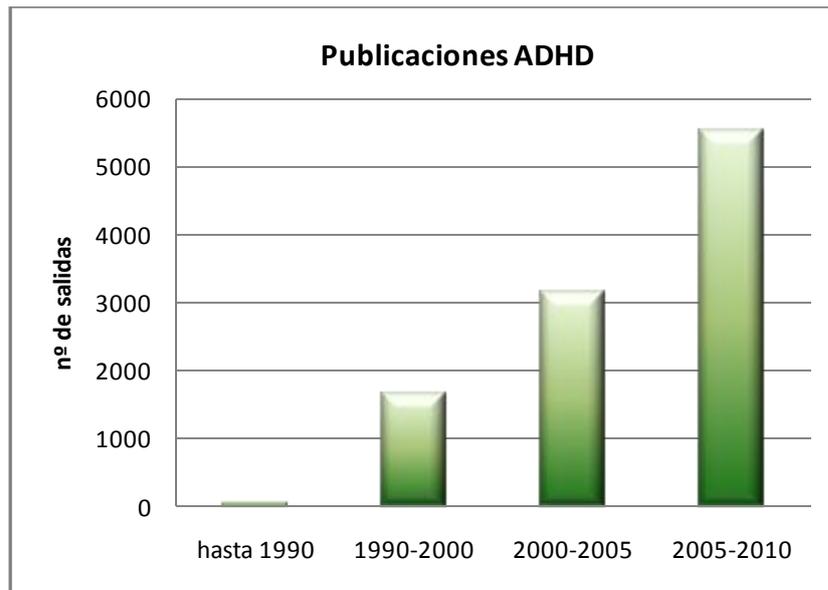


Figura 16.- Gráfica de barras que muestra las salidas que se obtienen en PubMed con la palabra “ADHD” (siglas en inglés equivalentes a TDAH) en los diferentes periodos de tiempo que se detallan. Se observa cómo el número de publicaciones sobre el trastorno ha crecido exponencialmente en los últimos años. Los datos graficados corresponden a los resultados de búsquedas hasta Septiembre de 2010.

A continuación, en la Figura 17, se muestra un esquema general de los pasos seguidos en el desarrollo de este trabajo. En este esquema se detallan las dos partes de las que se compone el estudio (estudio piloto y estudio completo), el número de muestras y polimorfismos incluidos, así como los objetivos y las técnicas empleadas en cada una de ellas. Es importante señalar que aunque se trata de un estudio de corte transversal, no retrospectivo, sí se han recopilado datos de los pacientes con TDAH de sus historias clínicas de forma retrospectiva en los casos en los que ha sido posible.

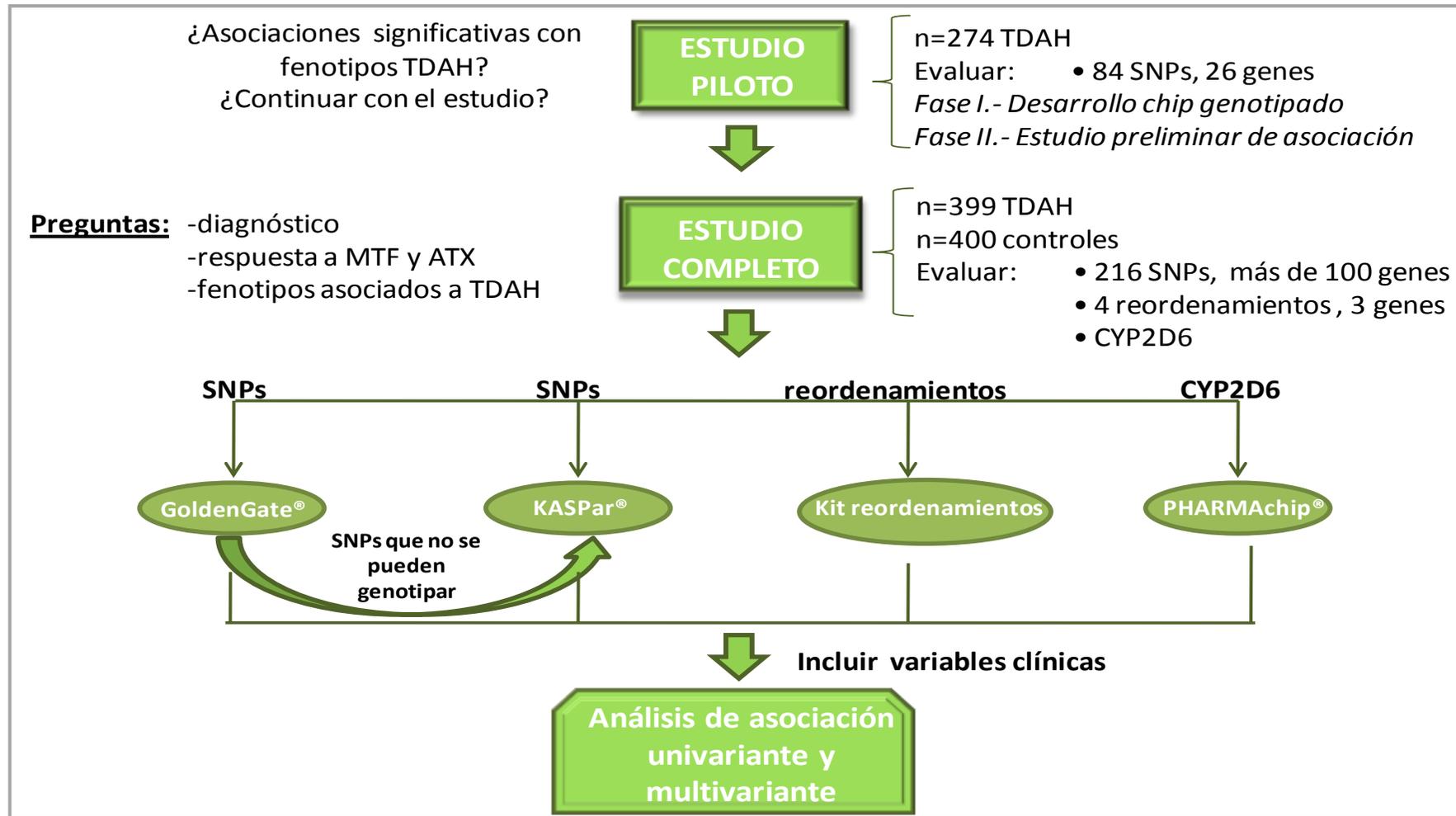


Figura 17.- Esquema explicativo del estudio que se va a llevar a cabo en este trabajo. Se muestran las dos partes de las que se compone el estudio y los objetivos de cada una de ellas, denominados estudio piloto y estudio completo de asociación. Del mismo modo, se muestran todas las técnicas utilizadas para el genotipado de los distintos polimorfismos: chip de ADN, tecnologías GoldenGate® y KASPar®, kit de detección de reordenamientos genómicos y VNTRs y PHARMAchip®.

4. ESTUDIO PILOTO

FASE 1: DISEÑO Y DESARROLLO DEL CHIP DE GENOTIPADO

4.1. BÚSQUEDA EN LA LITERATURA DE LOS SNPs

Para establecer los polimorfismos de cambio de nucleótido que eran interesantes incluir en el estudio piloto debido a su asociación con la enfermedad o con los diferentes fenotipos clínicos de interés, se realizó una exhaustiva búsqueda bibliográfica relacionada con la genética del TDAH a través de PubMed, en el sitio web del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), que contiene todas las referencias bibliográficas publicadas en revistas del ámbito de la biomedicina y depositadas en la *US National Library of Medicine*.

Posteriormente se valoró la relevancia de los más de 500 artículos encontrados, analizando aspectos como el número de pacientes de los estudios, la novedad de los SNPs analizados, el origen étnico de los pacientes, la calidad de la revista, los resultados obtenidos, o la fiabilidad de los métodos empleados. Los artículos más relevantes se descargaron de revistas especializadas como *Nature*, *Nature Genetics*, *American Journal of Medical Genetics*, *Biological Psychiatry*, *Molecular Psychiatry*, *Journal of Clinical Psychiatry*, *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, entre otras.

Se consideraron únicamente aquellos SNPs cuyas frecuencias alélicas habían sido previamente validadas y que fueran superiores al 10% (alelo menor) en la población de origen caucásico preferentemente. Se seleccionaron 84 SNPs como los más relevantes para formar parte del estudio piloto pertenecientes a 26 genes; todos ellos se muestran agrupados por los genes en los que se localizan, en la Tabla 12. Como se puede apreciar en esta tabla, la mayor parte de los genes seleccionados pertenecen a las vías de señalización tradicionalmente implicadas en el TDAH, la vía dopaminérgica, noradrenérgica y serotoninérgica, además de algunos genes implicados en el metabolismo y la formación de vesículas sinápticas principalmente.

Tras la selección de los SNPs de interés se procedió a buscar la secuencia exacta de cada polimorfismo, si se generaban cambios aminoacídicos o nuevos sitios de restricción y la localización cromosómica exacta de cada polimorfismo. Esto se realizó mediante un análisis exhaustivo tanto de artículos especializados como de bases de datos electrónicas (*ver direcciones en el apartado de páginas web*).

Tabla 12.- Tabla que muestra los 84 SNPs asociados a 26 genes que fueron incluidos en el chip de genotipado por haber mostrado asociaciones estadísticamente significativas con alguno de los fenotipos analizados. En la tabla se indica tanto el código rs del SNP como el gen al que pertenece.

| Gen | Código rs | Gen | Código rs |
|--------|------------|-----------|------------|
| ADRA2A | rs1800544 | DRD5 | rs2227842 |
| | rs553668 | | rs2227843 |
| ADRB2 | rs1042720 | | rs2227845 |
| | rs1042713 | | rs2227847 |
| | rs1042714 | | rs2227850 |
| | rs1042717 | FADS2 | rs174611 |
| | rs1042718 | | rs498793 |
| | rs1042719 | GRIN2A | rs8049651 |
| AR | rs6152 | GRIN2B | rs2268115 |
| ARRB2 | rs7208257 | | rs2284407 |
| | rs1045280 | | rs2284411 |
| BDNF | rs6265 | | rs2300256 |
| CHRNA4 | rs1044393 | HTR1B | rs6296 |
| | rs1044394 | HTR2A | rs6311 |
| | rs1044396 | | rs6313 |
| | rs1044397 | | rs6314 |
| | rs2229959 | MAOA | rs6323 |
| | rs2229960 | NGF | rs6330 |
| | rs2273505 | PNMT | rs7946 |
| | rs2273506 | | rs897453 |
| CNR1 | rs806370 | SLC6A2 | rs5569 |
| | rs4707436 | | rs998424 |
| | rs806368 | | rs3785157 |
| | rs806369 | SLC6A4 | rs2228673 |
| | rs806371 | | rs28914828 |
| | rs806372 | | rs6354 |
| COMT | rs4680 | rs1042173 | |
| DAT1 | rs1042098 | SNAP25 | rs362567 |
| | rs11564774 | | rs363020 |
| | rs2032893 | | rs3746544 |
| | rs2269272 | | rs3787283 |
| | rs2652511 | | rs6077690 |
| | rs27072 | | rs363006 |
| | rs3776581 | SYP | rs17855914 |
| | rs3863145 | | rs2293945 |
| | rs40184 | | rs3817678 |
| | rs6347 | | rs5906754 |
| DBH | rs1611115 | TPH2 | rs1386493 |
| | rs2519152 | | rs1843809 |
| DDC | rs11765748 | | rs4565946 |
| | rs17133878 | | rs4570625 |
| DRD5 | rs16888561 | | rs1386497 |

Se planteó elaborar un ADN chip ó chip de genotipado que fuera capaz de genotipar todos los SNPs seleccionados en una única reacción de hibridación. Para su desarrollo se siguieron los pasos que se describen a continuación, basándonos en otros desarrollos de chips de genotipado previos (Tejedor et al. 2005).

4.2. DISEÑO DE CEBADORES ESPECÍFICOS

Se diseñaron cebadores específicos para amplificar los fragmentos de los genes que los contenían. Para conseguir que las condiciones de amplificación de cada fragmento fueran lo más homogéneas posibles y que la reacción de amplificación (PCR) fuera óptima, se diseñaron cuidadosamente las parejas de cebadores con la ayuda del programa Primer 3 v.0.4.0 de uso público a través de internet. Este software permite seleccionar la región de interés a amplificar y a partir de ello, restringir ciertos parámetros como el tamaño de **amplicón**. Siempre que es posible, según las características de cada secuencia, ofrece como resultado varias parejas de cebadores válidas. En la Figura 18 se muestra una salida de este programa para una región del gen DRD4, como ejemplo de la información que ofrece. Posteriormente, los cebadores fueron sintetizados por Invitrogen Life Technologies.

Al diseñar estos cebadores se tuvo en cuenta la proximidad de algunos SNPs dentro de un mismo gen para su amplificación conjunta y de esa manera disminuir el número de reacciones de amplificación y el número de fragmentos a incluir en las PCRs multiplex. Además se prestó especial atención a que todos los fragmentos resultantes tuvieran un tamaño similar para que ningún fragmento se viera favorecido/dificultado en la reacción de PCR multiplex. Del mismo modo se intentó que estos fragmentos se diferenciaran entre ellos en unas pocas bases para poder detectarlos en el analizador genético capilar y poder conocer el rendimiento de la PCR sin necesidad de hibridar la muestra a modo de control interno para las PCRs. Del mismo modo, se seleccionaron aquellas parejas de cebadores que no tuvieran mucho contenido en GCs. Se analizó si existía la posibilidad de que formaran dímeros de primers así como si su temperatura óptima de hibridación era similar a la del resto de cebadores y a las condiciones de amplificación.

Finalmente, al diseñar la secuencia del cebador, se le añadió una secuencia complementaria a un cebador común (uno común directo y uno reverso) en el extremo 5' para facilitar la amplificación en la reacción de PCR multiplex.

duplicado y con un control negativo en el que en vez de ADN se añadió agua para descartar posibles contaminaciones de los cebadores. Si no se produjo amplificación para algún SNP se diseñó una nueva pareja de cebadores para ese polimorfismo, abarcando una región diferente y cambiando las características de los cebadores hasta que se consiguió una óptima amplificación.

Para las PCRs individuales se han utilizado los siguientes reactivos, DNA polimerasa Amplitaq[®] Gold, GeneAmp 10X PCR Buffer II, MgCl₂ 25 mM y dNTP Mix. El marcador de peso molecular utilizado en los geles de agarosa fue 1 Kb DNA Ladder. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 9700.

4.4. CONFIRMACIÓN POR SECUENCIACIÓN

El análisis más detallado de la estructura del ADN y lo que nos confirmará que el fragmento que estamos amplificando es el de nuestro interés, se realiza mediante secuenciación y consiste en descifrar la secuencia exacta de nucleótidos de ese fragmento de ADN. El primer método de secuenciación rápido fue el de terminación de la cadena utilizando dideoxynucleótidos trifosfato (ddNTPs), desarrollado por Frederick Sanger (Sanger 1975). A lo largo del tiempo se han desarrollado diferentes métodos para obtener la secuencia de nucleótidos del ADN, marcando el cebador o el terminador con radiactividad o con fluorescencia, desarrollándose métodos de secuenciación automática e incluso estrategias de secuenciación a gran escala.

En las reacciones de secuenciación que se describen en este trabajo se ha utilizado el método de secuenciación por terminador fluorescente de forma automatizada que es el método más ampliamente utilizado en la actualidad. En este método se utilizan ddNTPs que terminan la cadena marcados con fluorocromos, utilizándose un fluorocromo de distinto color para cada una de las cuatro bases del ADN en la reacción de PCR. Cuando se incorpora uno de estos ddNTPs se detiene la elongación y queda marcada la última base que se ha incorporado. Se ha utilizado el kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing[®] que contiene la polimerasa, MgCl₂, dNTPs normales, ddNTPs marcados y un tampón adecuado para la reacción. Se obtienen fragmentos de distinto tamaño, con su última base marcada con fluorescencia a diferentes longitudes de onda según la base de la que se trate. El mismo analizador genético capilar (ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer) que sirve para realizar el análisis de fragmentos se puede utilizar también para secuenciar, cambiando simplemente el polímero a través del cual se va a realizar la electroforesis (hay polímeros que admiten ambos tipos de análisis). Se lleva a cabo la separación del ADN basada en el tamaño (por electroforesis capilar) y al mismo tiempo se detecta y registra la coloración fluorescente, dando los resultados en forma de cromatogramas donde se registran los picos de fluorescencia (los fragmentos de menor tamaño que ya han sido detectados se dejan escapar del gel). En la Figura 19 se describen todos los pasos que se dan en la secuenciación por terminador fluorescente de la cadena de forma automatizada y que se acaban de describir.

Las condiciones y protocolo para la secuenciación fueron las recomendadas por *Applied Biosystems*[®]. Una vez obtenida la secuencia exacta de cada fragmento se compara con la secuencia teórica esperada mediante la herramienta de uso público a través de internet BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI. Ambas secuencias deben coincidir.

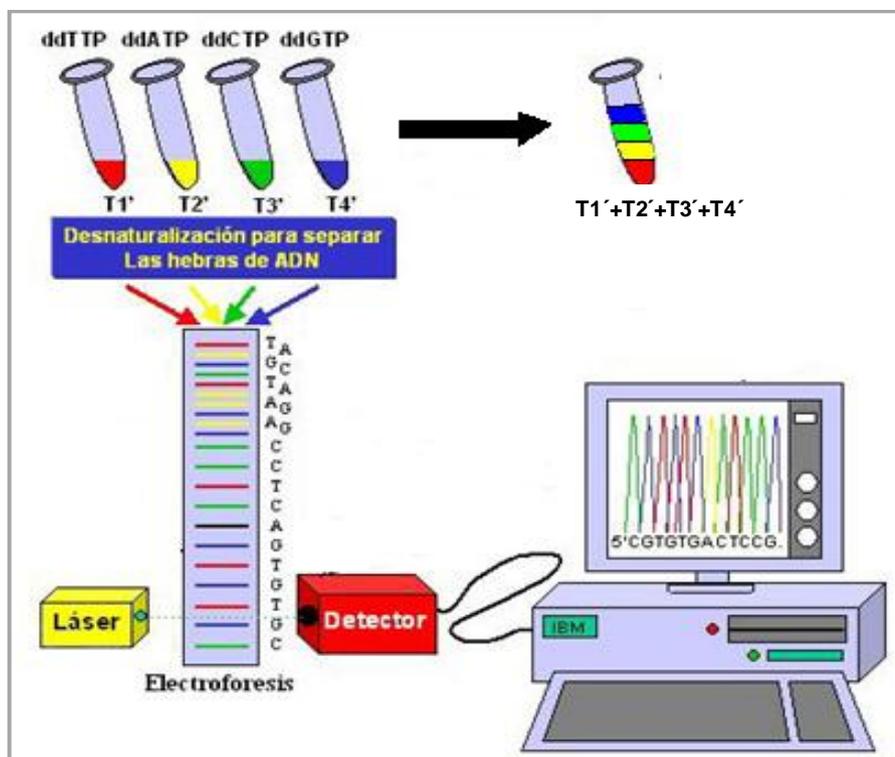


Figura 19.- Dibujo esquemático que representa de forma abreviada el método automático de secuenciación por terminador fluorescente. Se muestran los ddNTPs, cada uno marcado con un color diferente, cómo los fragmentos migran de forma diferente según su tamaño en la electroforesis capilar, cómo el láser va recogiendo la señal fluorescente de cada uno de estos fragmentos y finalmente cómo se muestra el resultado de la secuenciación en forma de cromatograma.

4.5. OPTIMIZACIÓN DE LAS PCRs MULTIPLEX

Una vez que se comprobó que los cebadores funcionaban correctamente y amplificaban de forma específica la región de interés de forma individual, para minimizar el número de reacciones a realizar, se procedió a poner a punto las reacciones de PCRs multiplex (MPX) con todos los fragmentos de interés. Se agruparon el máximo número de fragmentos en el menor número de reacciones posibles (en teoría, como máximo 20 fragmentos por reacción). Todos los pasos para optimizar una reacción de PCR MPX están descritos (Henegariu et al. 1997). Basándonos en estas directrices, se optimizó la temperatura de unión del cebador, el número de ciclos de la PCR, la cantidad de cada uno de los cebadores que se añadía a la mix, la cantidad de DNA, se cambiaron de grupo algunos fragmentos problemáticos e incluso se diseñaron nuevas parejas de cebadores en el caso que fuera necesario. De igual forma, para potenciar la reacción de

amplificación de todos los fragmentos se utilizaron unos cebadores comunes (TAGs ó colas) complementarios a una región de los cebadores que se añadieron a las reacciones en una alta concentración que se ajustó para cada reacción en particular.

La correcta amplificación de todos los fragmentos de cada grupo se visualizó mediante un analizador genético capilar, modelo ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer. Este análisis consiste básicamente en realizar una electroforesis a nivel capilar y una detección de los fragmentos inducida por láser. Se utiliza un marcador de peso molecular (GeneScan 500 ROX) y los diferentes fragmentos se detectan mediante el software de análisis Peak Scanner Software v1.0. Se utilizó solamente un fluoróforo para marcar todos los productos de PCR (-FAM) que se une al cebador común (cola) por lo que en la reacción de PCR se marcan todos los productos. Al tratarse de muchos fragmentos con tamaños muy similares, un gel de agarosa no es lo suficientemente resolutivo para diferenciarlos. El tamaño de los fragmentos debe diferir en al menos 2 pares de bases (pb) para distinguirlos correctamente; con esta técnica se comprueba que la intensidad de los amplificados sea suficiente para su posterior hibridación en el chip. El análisis de fragmentos genético capilar se explica con más detalle en el apartado 5.7.4. junto con la descripción de la obtención de resultados del kit de detección de reordenamientos genómicos y VNTRs. Una vez que las PCRs se pusieron a punto, se comprueba que se ha producido amplificación mediante un gel de agarosa al 2% solamente para comprobar que la reacción ha funcionado; no es necesario analizar cada uno de los fragmentos por electroforesis capilar.

El kit de amplificación utilizado para las reacciones de PCR MPX fue QIAGEN Multiplex PCR Kit y las colas marcadas (FAM) fueron ABI PRISM[®] Primer Pairs. La PCR MPX se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 9700 con la colección de ADNs de la población general propiedad de Progenika Biopharma S.A.

4.6. DISEÑO DE LAS SECUENCIAS DE OLIGONUCLEOTIDOS

Para la detección de los distintos SNPs en el chip de genotipado se diseñaron dos parejas de oligonucleótidos para cada polimorfismo. Una pareja sirve para la detección del alelo normal y la otra pareja para el alelo mutante. La longitud de los oligonucleótidos oscila entre 17 y 27 nucleótidos. Se partió de oligonucleótidos de 23 nucleótidos, quedando la base polimórfica en la posición central y 11 nucleótidos a cada lado. En la Tabla 13 se muestra un ejemplo de diseño de oligonucleótidos de detección para un SNP determinado (A/G). Posteriormente, se puede modificar esta longitud para conseguir máxima discriminación entre el alelo normal y el mutado. Para mejorar la capacidad discriminatoria, se seleccionan oligonucleótidos de menor tamaño y para aumentar la señal de hibridación, se seleccionan oligonucleótidos de mayor tamaño.

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Invitrogen Life Technologies y tras ser resuspendidos adecuadamente, se cuantificaron mediante un espectrofotómetro del modelo NaNoDrop 1000 para comprobar que se encontraban a la concentración óptima para las condiciones de producción del chip e hibridación. Se colocaron de forma ordenada en placas de 384 pocillos modelo microtiter de la marca NUNC® y se les añadió el disolvente orgánico dimetilsulfóxido (DMSO) para que adquirieran la consistencia adecuada para la producción del chip.

Tabla 13.- Tabla que muestra un ejemplo de diseño de los 4 oligonucleótidos para un SNP dado. La secuencia del oligonucleótido se encuentra subrayada (cambio de A por G). La base que se sitúa en medio marcada en rojo y en negrita representa el SNP que se quiere genotipar.

```
GACTTAAGTTTTAAGTGAATATTTTAATAAAGATCTGTGTAACAAAAAAC AACCTAATGTTAAGAGATGAC
AGAGTACATATTTGGCACCCATGGCACCATTAAGGAGAGATCTAGTAACATATTAAACAAAGTTTCAGAGT
TCATCATGACAGTTGACAGAACATTGTATTATTGGTTTGGTTTGGCTCGGCTTGCCCTAAATAGATACCG
TAGACCTATTTTAATACCTGATGTGAA
```

| | Sentido | Antisentido |
|--------|----------------------------------|----------------------------------|
| Normal | GCACCCATGGC A CCATTAAGGAG | CTCCTTAATGG T GCCATGGGTGC |
| Mutado | GCACCCATGGC G CCATTAAGGAG | CTCCTTAATGG C GCCATGGGTGC |

4.7. PRODUCCIÓN DEL CHIP DE GENOTIPADO

La producción de chips de vidrio a partir de los oligonucleótidos diseñados complementarios a los SNPs de interés, se llevó a cabo con un sistema robótico (“*spotter o microarrayer*” en inglés) especialmente diseñado para dicha tarea. Los robots que se utilizaron para la producción de los DNACHIPS son el Modelo MicroGrid 610 y los Modelos Nanoprint 210 y 60. Los requerimientos de trabajo de estas máquinas son muy estrictos, necesitando condiciones de limpieza, temperatura y humedad controladas en la sala donde se encuentre ubicado, para que los puntos (spots) tengan la morfología adecuada y no se solapen unos con otros.

El robot depositó los oligonucleótidos de forma ordenada en la superficie del vidrio (portaobjetos) en forma de puntos (“spots”). El tamaño de dichos puntos osciló entre 120 a 150 micras, con una distancia entre ellos comprendida entre 250 y 300 micras para evitar que un oligonucleótido se contamine con el adyacente. Tras la impresión de los oligonucleótidos sobre la superficie del portaobjetos, el chip de genotipado se sometió a radiación ultravioleta y calentamiento a 8 °C para fijar los oligonucleótidos de forma covalente a la superficie del vidrio.

Cada oligonucleótido se deposita 20 veces de forma ordenada sobre toda la superficie del chip para maximizar la probabilidad de éxito del genotipado. Por ejemplo, si por una mancha no

se puede leer la intensidad de hibridación de una región del chip, las otras réplicas de los oligonucleótidos emitirán señal y se podrá genotipar correctamente (Draghici et al. 2001). Como los oligonucleótidos se depositan por toda la superficie del chip, al mismo tiempo que se produce el chip se crea un archivo (gradilla) que indicará a qué oligonucleótido y mutación corresponde cada uno de los puntos en el momento del escaneo. En la Figura 20 se muestran unas fotografías de estos robots depositando los oligonucleótidos.



Figura 20.- Fotografías de un robot Modelo MicroGrid 610 con el que se ha producido el chip de genotipado. En la fotografía de la izquierda se muestra el robot completo mientras que en la fotografía de la derecha se muestran los portaobjetos ordenados en una de las bandejas del robot y el brazo con las puntas (pinholes) que depositan los oligonucleótidos sobre su superficie.

Además de los oligonucleótidos diseñados para la detección de todos los SNPs de interés, en la superficie de vidrio se depositaron también unos oligonucleótidos control, complementarios a unas regiones que se añadirán a todas las muestras antes de la hibridación, para asegurar que el proceso de hibridación ha funcionado correctamente. De igual forma se añaden también spots que solamente contienen el diluyente de los oligonucleótidos para descartar cualquier contaminación (blanco).

4.8. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LA HIBRIDACIÓN

Una vez que se ha llevado a cabo y se ha comprobado la correcta amplificación de todos los grupos de PCR multiplex en gel de agarosa al 2% (75 ml TAE, 1,5 gr de agarosa y 4 µl de bromuro de etidio), se cargan 4 µl de cada grupo de PCR multiplex junto con 5 µl de buffer de carga diluido 1:5.

Por otro lado, los **DNA chips** ya han sido producidos como se ha explicado en el apartado anterior. Es el momento de preparar las muestras para su posterior hibridación. Para ello, el primer paso es juntar todos los grupos de PCR pertenecientes a cada muestra a analizar, y posteriormente para optimizar la hibridación se fragmentan y marcan como se detalla a continuación.

4.8.1. FRAGMENTACIÓN DE LA MUESTRA

El primer paso es juntar los distintos grupos de PCR multiplex que corresponden a una misma muestra (por cada muestra habrá un número determinado de PCRs multiplex para amplificar todos los fragmentos de interés). A continuación, se fragmentan parcialmente para facilitar su accesibilidad a los oligonucleótidos de detección del chip garantizando la máxima hibridación y la máxima discriminación en la detección de los alelos.

El proceso de fragmentación es un proceso enzimático con una mezcla de DNAsa (1 U/ μ l) y fosfatasa alcalina (1 U/ μ l), junto con EDTA 20 mM y agua libre de nucleasas, y realizándose la incubación con calor. La cantidad de reactivos que se añaden para la fragmentación, sobre todo del enzima, la temperatura y el tiempo de incubación para que la fragmentación sea la adecuada, debe determinarse empíricamente. Es importante que los productos de amplificación no se fragmenten demasiado ya que si esto ocurriera aumentaría la hibridación inespecífica (ruido de fondo) y se distorsionaría la verdadera hibridación. Por otro lado si la fragmentación es escasa, la señal de hibridación será muy baja. La incubación con calor se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 9700 y puede observarse un dibujo esquemático de este proceso en la Figura 21.

4.8.2. MARCAJE DE LA MUESTRA

La técnica de hibridación de oligonucleótidos en portas de vidrio y detección de diferentes polimorfismos genéticos mediante hibridación y análisis de la fluorescencia emitida, fue descrita por primera vez por Guo y colaboradores (Guo et al. 1994). Tras la fragmentación en condiciones controladas, se realizó la reacción de marcaje indirecto mediante la incorporación de una molécula de biotina y el posterior revelado con el conjugado Cy3-estreptavidina. Para ello se añade una mezcla que contiene la enzima transferasa terminal (400 U/ μ l), un tampón adecuado, cloruro de cobalto y biotina-11-ddUTP y se incuba durante 1 hora a 37°C para favorecer la biotilización de todos los fragmentos.

La biotina no emite ninguna señal detectable, pero sirve para detectar la unión de la muestra a sus oligonucleótidos complementarios tras el proceso de hibridación. Este método de marcaje se conoce como marcaje indirecto, ya que si no se añade el conjugado estreptavidina- fluoróforo Cy3, el oligonucleótido biotilado no emite ninguna señal. El marcaje indirecto además sirve para amplificar la señal emitida y que sea más fácilmente detectable, ya que una sola biotina es capaz

de unir muchas moléculas de estreptavidina-Cy3. La incubación con calor se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 9700.

Al finalizar la reacción de marcaje, se añade un control externo (CE) de hibridación a cada tubo. Este CE es únicamente un oligonucleótido ya marcado que tiene sus complementarios en el chip y que, si el proceso de hibridación funciona correctamente, dará una señal determinada (siempre en el mismo rango). Si los oligonucleótidos control no dan señal, significará que ha ocurrido un problema durante el proceso de hibridación. Sin embargo, si éstos dan señal pero el resto de oligos no, indicará que el error ha ocurrido previamente en el proceso de fragmentación y marcaje.

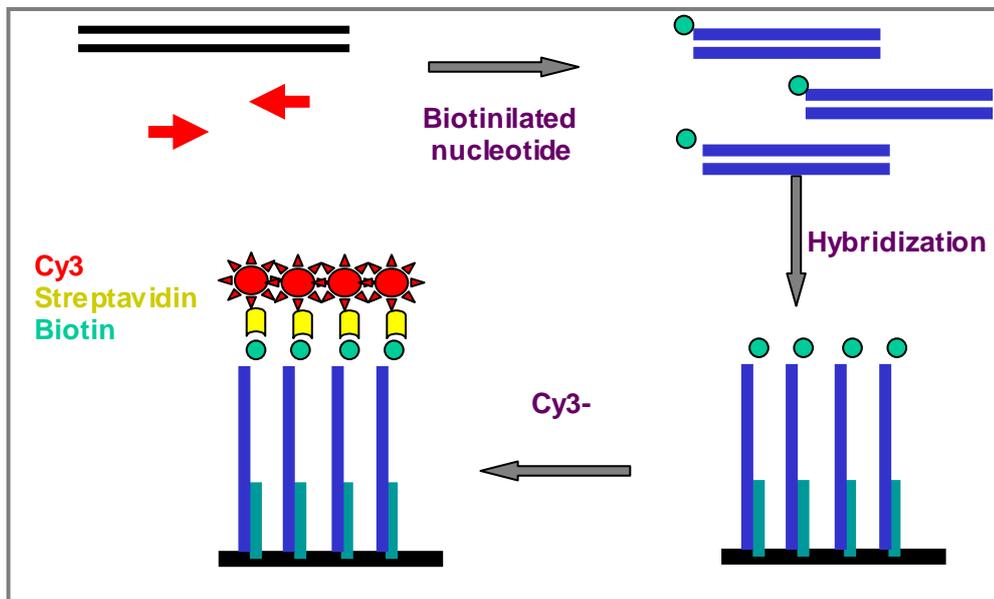


Figura 21.- Dibujo esquemático del proceso de fragmentación, marcaje e hibridación de un producto de PCR en el chip de genotipado. Se ve el fragmento de ADN amplificado en primer lugar (serían muchos fragmentos distintos para una misma muestra). A continuación se fragmentan y biotinilan esos fragmentos (marcaje), se hibridan por complementariedad de bases con los oligonucleótidos depositados en el chip. Y finalmente se ve como se “revela” y amplifica este marcaje con la adición de estreptavidina-Cy3.

4.9. HIBRIDACIÓN DE LA MUESTRA EN EL CHIP DE GENOTIPADO

Los productos de PCR amplificados a partir de la colección de ADNs de la población general, una vez fragmentados y marcados, se desnaturalizaron (para tener el ADN en forma de hebra simple) durante 5 minutos a una temperatura de 95°C e inmediatamente se depositaron en hielo, para evitar que renaturalizaran de nuevo antes de ser hibridados en el chip. El tiempo transcurrido entre la desnaturalización y la hibridación debe ser el menor posible.

La hibridación de las muestras en los chips se llevó a cabo en la estación automática de hibridación Ventana Discovery que se muestra en la Figura 22 y todos los reactivos y tampones utilizados en las reacciones de hibridación descritas fueron suministrados por el mismo proveedor, Ventana Medical Systems Inc. En un turno de hibridación (duración total de unas 3 horas y media) se pueden hibridar 30 chips con 30 muestras diferentes a la vez, siempre y cuando las condiciones de hibridación, volumen y número de reactivos sean para todos ellos las mismas.



Figura 22.- Fotografías de la estación de hibridación Ventana Discovery que se ha utilizado en el desarrollo del chip de genotipado. En la primera fotografía se observa cómo mediante una pipeta P-1000 se deposita la muestra sobre el chip una vez que ésta ha sido fragmentada, marcada y desnaturalizada para su hibridación. Se observa la disposición circular de los chips. En la segunda fotografía se muestra la estación completa, donde se pueden ver tanto los reactivos necesarios para la hibridación como los bidones de los búferes de incubación y lavado. La capacidad máxima de hibridación de esta estación es de 30 chips por turno.

El proceso de hibridación consta fundamentalmente de tres pasos; pretratamiento, hibridación y revelado. Además de los sucesivos lavados y el secado final.

El primer paso conocido como **pretratamiento/prehibridación** consiste en “bloquear” la superficie del chip donde no hay oligonucleótidos para evitar que se produzcan hibridaciones inespecíficas. Para ello se trata la superficie de los chips con dos tampones compuestos de formamida deionizada, dodecilsulfato sódico (SDS) 10% y seroalbúmina bovina (ChipSpread A y B) y se incuba a 42°C durante una hora y media. La formamida tiene la propiedad de formar puentes de hidrógeno con los ácidos nucleicos desestabilizando la formación de dímeros. Por otra parte la seroalbúmina aumenta la concentración efectiva de ADN ya que ocupa el volumen de agua y el SDS es un detergente que rompe enlaces no covalentes. Tras este proceso se

realiza un lavado con un tampón salino compuesto de citrato y cloruro de sodio, tratándose de un lavado astringente suave que potenciará la hibridación.

A continuación (unos 45 minutos después) se realiza la **hibridación** propiamente dicha. Las muestras previamente mezcladas con un tampón de hibridación comercialmente denominado ChipHybe que asegura las condiciones idóneas para que se de la hibridación, se añaden manualmente sobre la superficie de cada chip con la ayuda de una pipeta P-1000 con cuidado de no tocar la superficie del vidrio para no dañar los oligonucleótidos, como se muestra en la Figura 22. La hibridación dura una hora y se incuban a 45°C los chips con las muestras y un tampón de hibridación compuesto de cloruro y fosfato sódicos, EDTA, sulfato de dextrano y formamida que facilita la hibridación por complementariedad entre bases. En la Figura 23 se representa este proceso. Finalmente se realiza un lavado con el reactivo ChipClean para eliminar el exceso de muestra marcada que no se ha unido así como la hibridación inespecífica.

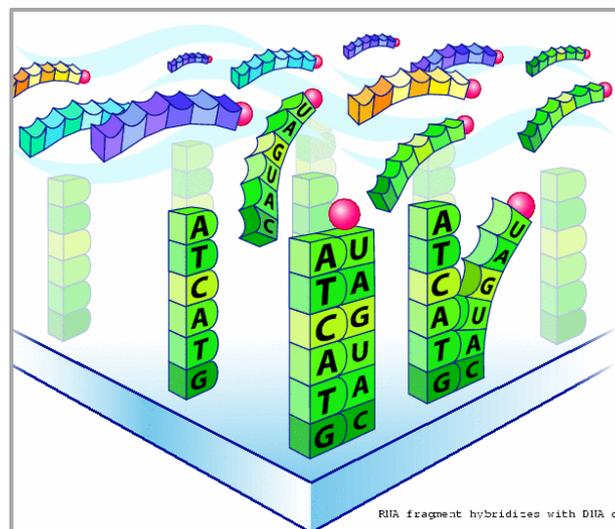


Figura 23.- Dibujo esquemático que representa el proceso de hibridación. Se observa cómo los oligonucleótidos sobre la superficie del chip hibridan con los fragmentos de muestra marcados (el marcaje se representa con las bolitas de color rosa) por complementariedad de bases.

El último paso del proceso es el del “revelado”. Los chips se tiñen automáticamente por la propia estación de hibridación con la estreptavidina conjugada con el fluoróforo Cy3, que es lo que permitirá detectar la fluorescencia proporcional a la hibridación en el escaneado. Se incuba durante 12 minutos a 37°C para favorecer la unión. Tras este revelado se realizan unos nuevos lavados con distintos tampones y detergentes para eliminar el exceso de conjugado estreptavidina-Cy3 que no se haya unido a las moléculas de biotina de los fragmentos de las muestras hibridadas con los oligonucleótidos del chip. Finalmente, se sacan los chips de la estación de hibridación y se realiza un último paso de lavado manual, agitando los chips en dos cubetas, una con agua destilada y otra con etanol 70% y se secan centrifugándolos en la centrifuga de placas a 170 RCF (Fuerza Centrífuga Relativa) durante 4 minutos para evitar que se rompan durante el secado. Los chips estarían listos para ser escaneados, deben protegerse

de la luz y escanearse en las 48 horas posteriores a su hibridación para evitar la pérdida de la señal de fluorescencia.

Como se ha comentado anteriormente, se utilizan controles tanto negativos como externos para comprobar que la hibridación se ha producido correctamente y que no ha habido ninguna contaminación.

4.10. ESCANEADO Y CUANTIFICACIÓN DE LA HIBRIDACIÓN

4.10.1. ESCANEADO DEL CHIP DE GENOTIPADO

Posteriormente y dentro de las 48 horas siguientes a su hibridación los chips deben ser escaneados. Para ello, se ha utilizado un escáner fluorescente confocal modelo InnoScan[®] 700 que emite un haz de luz a 543 nm (luz verde) para excitar a Cy3 y recoge la señal de fluorescencia (los valores absolutos) emitida por el fluoróforo. El software informático que se utilizó para este proceso es MAPIX. Las condiciones óptimas de escaneado (valores PMT del láser) se establecieron para estos chips de genotipado en concreto, teniendo en cuenta los valores de intensidad obtenidos. Si la intensidad de irradiación del láser es muy elevada, se pueden llegar a saturar los spots y la señal de hibridación que se obtendría en la lectura no sería la real y no se mantendrían las relaciones de intensidad de hibridación entre los oligonucleótidos normal y mutado.

Un escáner fluorescente confocal, está formado por una serie de espejos y filtros que son los que direccionan los láseres y discriminan entre la luz de excitación y la emitida y que, en el caso de chips con marcaje múltiple (además del fluoróforo Cy3 con Cy5 por ejemplo) y detección simultánea, separan el espectro de emisión para detectar los dos fluoróforos de forma diferencial. En la Figura 24 se muestra detalladamente los componentes de un escáner fluorescente confocal. Este tipo de escáner puede distinguir hasta 65.000 intensidades diferentes de fluorescencia, siendo éste el valor máximo numérico que proporciona.

Una vez que se introduce el chip en el escáner, se produce la excitación por láser del fluoróforo, para lo que se produce el direccionamiento espacial del espejo del láser, de la muestra, o de ambos. Al mismo tiempo se produce la captación por una lente del objetivo de la luz emitida por el fluoróforo Cy3 para lo que es necesaria la correcta discriminación de los haces de luz de excitación y emisión por el filtro, y finalmente se produce la detección de la intensidad de fluorescencia emitida. El tubo fotomultiplicador (PMT) convierte los fotones en una señal eléctrica, que es transformada en una imagen digital de bits/pixel por medio de un convertidor. Se obtiene una imagen como la que se presenta en la Figura 25, en una escala log con un color falso (rojo y verde son los más habituales). Después, superponiendo la gradilla que se elabora en el momento de producción del chip, se conoce la correspondencia entre cada uno de los puntos y

los oligonucleótidos y mutaciones a los que hacen referencia. La intensidad de fluorescencia emitida es proporcional a la hibridación y según con qué oligonucleótidos hibride la muestra, se sabrá si se trata de un individuo homocigoto para el alelo salvaje (sólo hibridará con los oligonucleótidos correspondientes al alelo salvaje, con el directo y el reverso), o mutado (sólo hibridará con los dos correspondientes al mutado), o si se trata de un individuo heterocigoto (hibridará con los cuatro oligonucleótidos), como se muestra en la Figura 25.

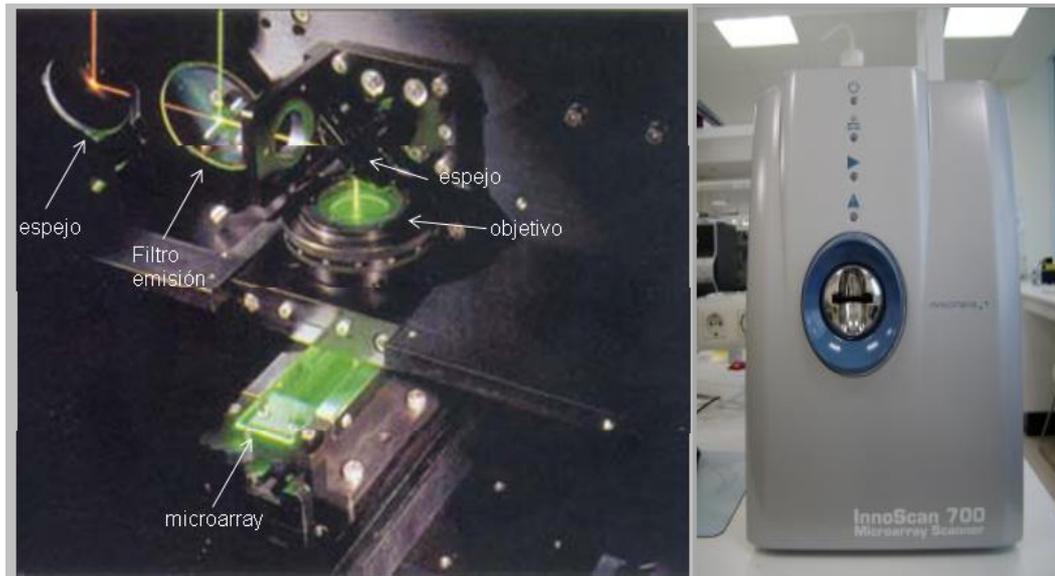


Figura 24.- Fotografías de un escáner fluorescente confocal. En la primera imagen se muestran detalladamente todos los componentes del escáner confocal que son los que permiten recoger la señal de fluorescencia del fluoróforo tras ser excitado mediante un sistema de espejos y filtros. En la segunda fotografía se muestra un escáner modelo InnoScan® 700 con el que se han escaneado los chips de genotipado.

Además de los valores brutos de emisión de fluorescencia de los oligonucleótidos complementarios a todas las regiones de interés y los valores de fondo correspondientes a la hibridación inespecífica, se recogen también los valores de señal emitida de los oligonucleótidos controles de la hibridación y de los puntos del blanco correspondientes a los controles de una posible contaminación (estos últimos valores de señal deberán ser cercanos a los valores del fondo si no existe contaminación), ambos se utilizan como puntos de control en todo momento.

En la Figura 26 se muestran de forma esquemática todo el proceso que se ha descrito, desde la extracción del ADN y producción de los chips hasta la lectura y análisis de los resultados.

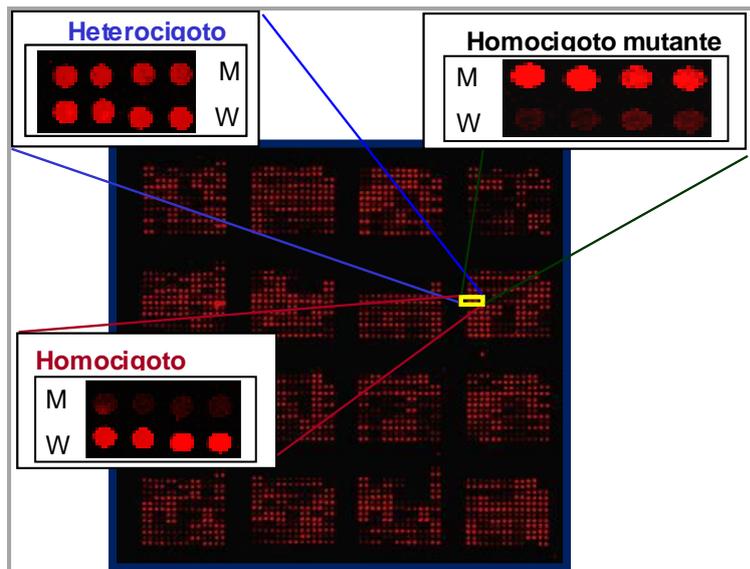


Figura 25.- Imagen del escaneado de un chip tras la hibridación, en el que se muestran los tres resultados posibles si se trata de un individuo homocigoto para el alelo salvaje, para el mutado o heterocigoto (M; Mutante, W; normal, del inglés Wildtype).

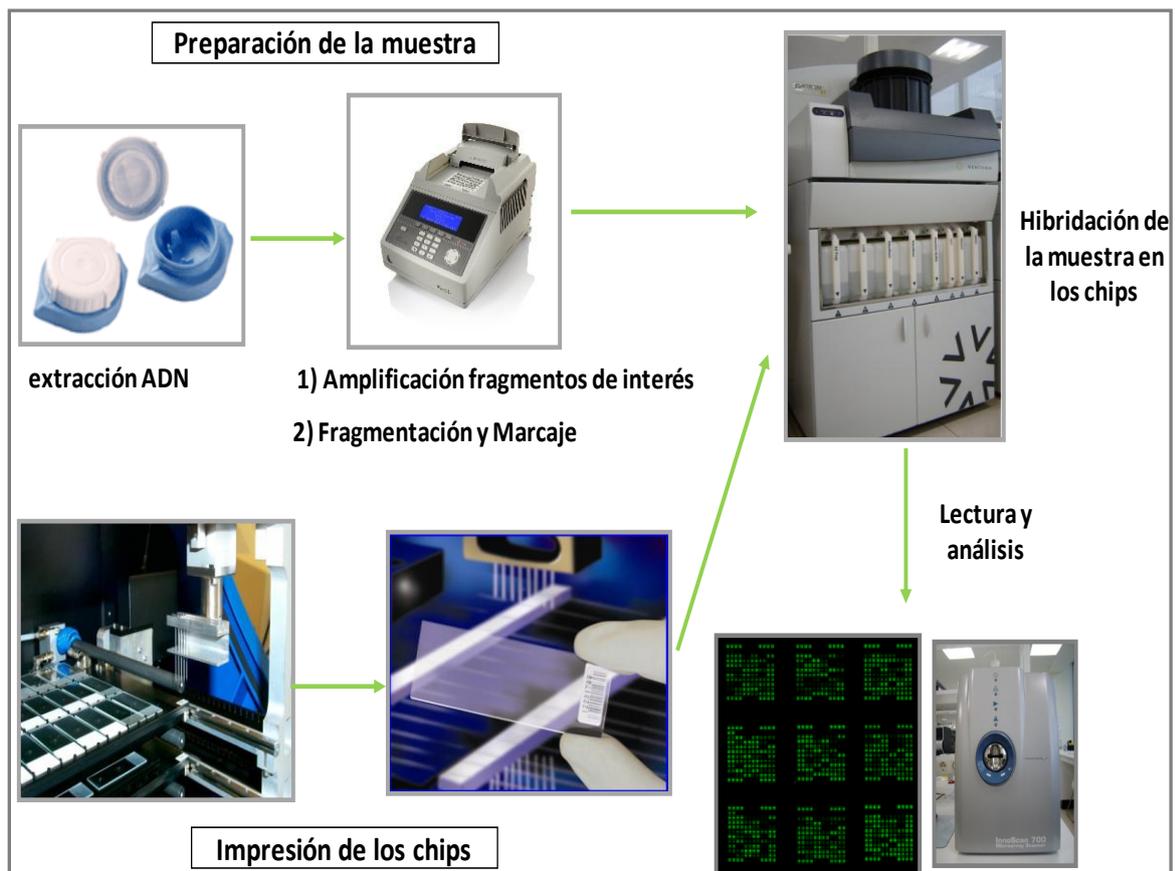


Figura 26.- Esquema de los pasos que se siguen en el estudio preliminar de asociación mediante el chip de genotipado. En la parte de arriba de la figura se muestra la preparación de las muestras (extracción de ADN, amplificación, fragmentación y marcaje). En la parte inferior se muestra el proceso de producción de los chips y ambas vías (preparación de la muestra y producción del chip) confluyen en la parte derecha en el proceso de hibridación. El paso final es el de la lectura del chip y análisis de los resultados.

4.10.2. CUANTIFICACIÓN DE LA HIBRIDACIÓN

Para la cuantificación de los valores brutos de las señales de hibridación y el correcto análisis de los resultados de genotipado de las muestras se ha utilizado el software MAPIX. A partir de los valores de intensidad para cada pareja de oligonucleótidos correspondientes a un SNP determinado, se calculan las relaciones de las intensidades de los oligonucleótidos normales y mutados en relación a la intensidad del fondo. Dichos ratios se representan enfrentados y se deben observar tres conjuntos de puntos (clusters), que se corresponden con los tres posibles genotipos AA, AB y BB. Si estos grupos están bien diferenciados entre sí indica que los oligonucleótidos son capaces de discriminar correctamente los tres genotipos posibles. En la Figura 27 se muestra una de estas representaciones para un SNP teórico A/B, en un caso ideal de discriminación. En concreto los valores que se representan gráficamente son lo que se denominan ratio 1 y ratio 2 de hibridación para un SNP determinado, que se describen más detalladamente a continuación en la Tabla 14. Si uno de los dos ratios no funciona correctamente (no hibrida o no discrimina) se puede representar el que sale bien frente a sí mismo; es decir, si una pareja de oligonucleótidos no funciona (la sentido o la antisentido), se puede utilizar la pareja que funciona por duplicado.

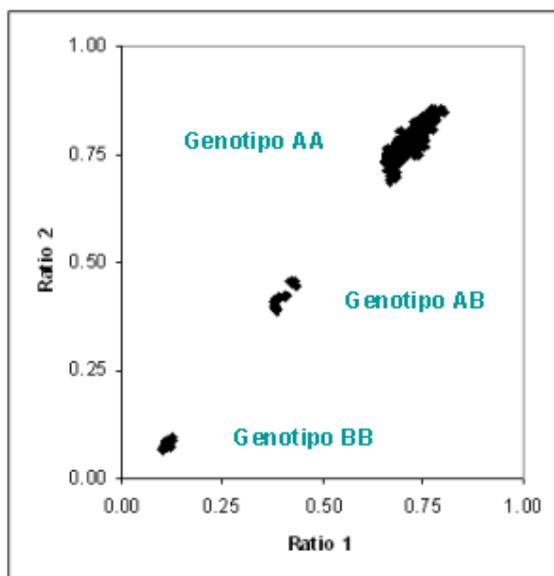


Figura 27.- Representación ideal a modo de ejemplo del valor de las intensidades de hibridación de los oligonucleótidos normal y mutado para un SNP. Cada uno de los puntos representa el valor de la relación de las intensidades para una muestra. Se observa la correcta discriminación de los tres genotipos posibles para un polimorfismo determinado: genotipos AA, AB y BB.

Cuando se mencionan los valores de intensidad de hibridación de los oligonucleótidos se hace referencia a los valores de hibridación ya corregidos con los valores de emisión de fluorescencia del fondo (Intensidad emitida por el oligo - Intensidad emitida por el fondo), es decir, se restan los valores de emisión de las hibridaciones inespecíficas, para que los valores representados correspondan únicamente a los de hibridación específica de los oligos, la verdadera hibridación.

Tabla 14.- Tabla que muestra las fórmulas mediante las que se calculan los ratios 1 y 2 que se representan en una gráfica para observar los conjuntos de puntos que indicarán si los oligonucleótidos discriminan correctamente y darán información sobre los genotipos de ese SNP. El término media acotada se refiere a la media de las intensidades de hibridación de los oligonucleótidos quitando los dos valores de mayor intensidad y los de menor. Los que se denominan oligos 1 y 2 se corresponden con los que han sido diseñados sentido y los oligos 3 y 4 son los antisentido.

| | |
|----------------|---|
| Ratio 1 | Media acotada oligo 1 (más frecuente) |
| | Media acotada oligo 1 + media acotada oligo 2 |
| Ratio 2 | Media acotada oligo 3 (más frecuente) |
| | Media acotada oligo 3 + media acotada oligo 4 |

4.11. OPTIMIZACIÓN DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS DE DETECCIÓN

La representación gráfica de la Figura 27 corresponde a una situación ideal en la que ambas parejas de oligonucleótidos discriminan perfectamente y sus intensidades de hibridación también son ideales. Sin embargo, en un primer diseño de oligos esta situación es la más infrecuente. En muchos casos (cerca de un 60% de la totalidad de SNPs testados en este trabajo) se deben hacer ligeros reajustes en el diseño de las sondas o incluso cambiarlas totalmente. Este proceso es el denominado “optimización de los oligonucleótidos de detección”. El objetivo de esta optimización es el de comprobar si los oligonucleótidos diseñados hibridan, detectan y discriminan correctamente cada uno de los polimorfismos de interés y si no es así, optimizarlos en lo que sea posible, por ejemplo modificando su longitud.

Para mejorar la capacidad discriminadora de los oligonucleótidos se diseñarán nuevos oligonucleótidos de menor tamaño, mientras que para aumentar la señal de hibridación se utilizarán oligonucleótidos más largos. También es posible, como se ha comentado en el apartado anterior, utilizar una misma pareja de oligonucleótidos por duplicado si se estima que el genotipado será mejor de esta forma. Un ejemplo del resultado de optimización de oligonucleótidos para un SNP se muestra en la Figura 28.

En ocasiones, es necesario realizar varios rediseños hasta encontrar los que emitiendo señales de hibridación óptimas discriminen adecuadamente. Este proceso se lleva a cabo con la colección de ADNs de la población general, al igual que la validación técnica de la herramienta.

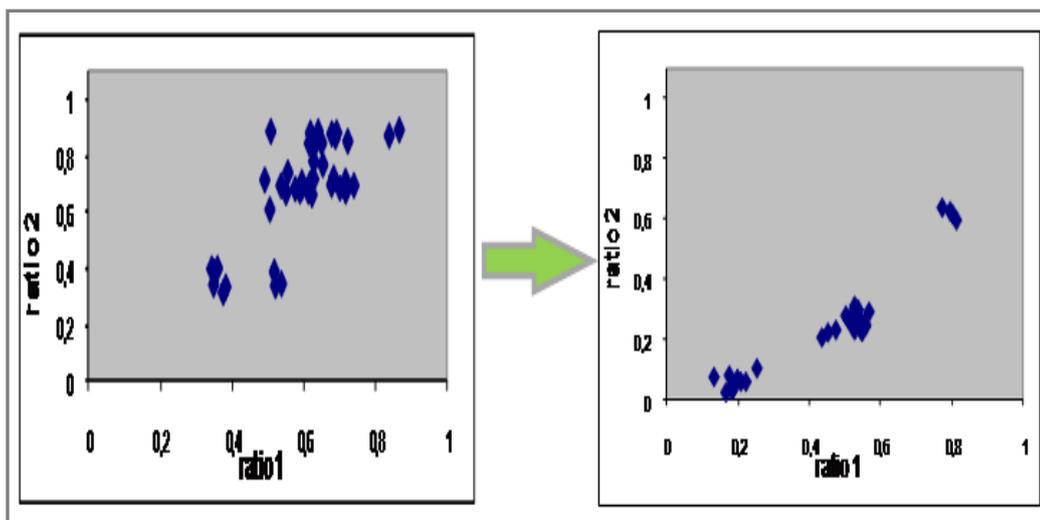


Figura 28.- Ejemplo de representaciones gráficas de la optimización de oligonucleótidos de detección para un SNP. Se observa cómo en la gráfica inicial no es posible distinguir los tres grupos de genotipos y cómo se ha conseguido una óptima discriminación con el nuevo diseño.

4.12. VALIDACIÓN TÉCNICA CHIP DE GENOTIPADO

Una vez que se han seleccionado por su correcta intensidad de hibridación y discriminación las sondas de detección definitivas del chip de genotipado, se debe realizar una validación técnica de la herramienta de genotipado. El objetivo de la validación técnica es el de asegurar que el chip genotipará correctamente de forma continuada y que las nubes de los genotipos se mantendrán estables, o lo que es lo mismo, evaluar la exactitud y robustez del chip de genotipado. Para testar esto, se analizan diez muestras o diez hibridaciones de la misma muestra por cada grupo genotípico (AA, AB y BB), se comprueba que el genotipo en todas ellas es correcto y que la conformación de las nubes (clusters) se mantiene estable. Además, se debe controlar que las relaciones entre los controles de hibridación se mantienen constantes y que no se produce hibridación con los puntos de control negativo del chip (puntos de DMSO).

Posteriormente, se hibrida una cantidad suficiente de muestras de las que ya se conoce su genotipo (muestras control), seleccionándose aquellas que mayor número de variantes aporten ya que se necesitará analizar al menos a un individuo heterocigoto para cada SNP (en este proyecto se estableció que genotipar 45 de las muestras de la colección de ADNs de Progenika Biopharma S.A. sería suficiente). Se comprueba que todas ellas sean genotipadas correctamente para todos los SNPs. Si no ocurre esto, o la señal de hibridación es baja, se diseñarán nuevos oligonucleótidos.

Tras este proceso de validación técnica del chip de genotipado, éste quedó listo para su utilización en el genotipado de las muestras de pacientes y la realización del análisis preliminar de asociación entre los distintos genotipos fenotipos asociados a TDAH y respuesta a MTF.

FASE 2: ANÁLISIS PRELIMINAR DE ASOCIACIÓN CON MUESTRAS DE PACIENTES DE TDAH

Se decidió genotipar las 274 primeras muestras de pacientes de TDAH recolectadas, mediante el chip de genotipado desarrollado. Las limitaciones y conclusiones de este genotipado se describen en el apartado de Resultados.

Posteriormente, para evaluar la capacidad pronóstica del chip de genotipado, se realizó un análisis preliminar de asociaciones individuales entre los genotipos de los SNPs y las siguientes variables: posible asociación con los diferentes subtipos de TDAH, posible asociación con la evolución de la sintomatología asociada al TDAH, posible asociación con una mayor o menor severidad de los síntomas y posible asociación con la presencia/ausencia de comorbilidades.

Las variables clínicas de estudio se definieron de la siguiente forma. Se consideró que mostraban mala evolución del TDAH a aquellos pacientes que no presentaban una variación superior del 30% de mejoría en los síntomas comparando las puntuaciones basales y actuales del Test DuPaul. Se consideró buena evolución si ocurría lo contrario, es decir, si presentaban porcentajes superiores al 30% entre la puntuación del test DuPaul basal y la actual en el momento del reclutamiento de la muestra para el estudio. El concepto de severidad por el contrario, se ha definido en base a la escala ICG (Escala de Impresión Clínica Global) de uso generalizado en Psiquiatría, mediante la cual el clínico establece la gravedad de la enfermedad en el momento de la consulta, con puntuaciones que oscilan entre el 1 y el 7 (Tabla 15). Se ha establecido como punto de corte el valor de puntuación 3. Se considera que aquellos pacientes con una puntuación igual o superior a 3 poseen mayor severidad de la sintomatología asociada a TDAH, mientras que los que tengan puntuaciones inferiores a 3 serían asintomáticos o mostrarían menor severidad de la sintomatología.

Tabla 15.-Tabla que muestra la escala ICG (Escala de Impresión Clínica Global), cada puntuación se muestra con su correspondiente explicación.

| | |
|---|---------------------|
| 0 | No evaluado |
| 1 | Mucho mejor |
| 2 | Moderadamente mejor |
| 3 | Levemente mejor |
| 4 | Sin cambio |
| 5 | Levemente peor |
| 6 | Moderadamente peor |
| 7 | Mucho peor |

Se consideró que existía comorbilidad cuando el paciente en el momento de la toma de muestra o previamente ya había sido diagnosticado con algún (al menos 1) trastorno psiquiátrico comórbido al TDAH. En el CRD, el campo a rellenar por el clínico se indica en la Tabla 16 se muestran los 5 trastornos psiquiátricos que han sido más comúnmente asociados al TDAH. Del mismo modo se consideró ausencia de comorbilidades cuando no se había descrito ningún trastorno comórbido.

Tabla 16.- Tabla que muestra el campo del CRD referente a la presencia/ausencia de comorbilidades a rellenar por el clínico en el momento de la recogida de la muestra. Se pueden marcar 1 ó más trastornos comórbidos simultáneamente.

| | |
|---|-----------------------------------|
| 1 | Trastorno Negativista Desafiante |
| 2 | Trastorno Disocial |
| 3 | Trastorno de Ansiedad |
| 4 | Trastorno Afectivo |
| 5 | Trastorno del aprendizaje escolar |
| 6 | Otros:..... |

Finalmente, la variable subtipo de TDAH se definió en base a los subtipos descritos en el DSM-IV-TR y se facilitó el análisis estadístico de asociación entre genotipo y fenotipo realizando siempre comparaciones dicotómicas del tipo: subtipo inatento versus subtipos combinado e hiperactivo/impulsivo. Se realizaron tres comparaciones diferentes en las que se compararon todos los subtipos. La comparación más lógica sería subtipo inatento vs hiperactivo/impulsivo+combinado, pero se decidió realizar también el resto de comparaciones para comprobar si las asociaciones obtenidas eran más robustas en esta comparación que en el resto, con la intención de confirmar si los subtipos hiperactivo/impulsivo y combinado tienen más en común entre sí que en relación al subtipo inatento como se describe en la bibliografía (Grizenko et al. 2010).

Los pasos que se llevaron a cabo para realizar este análisis preliminar de asociaciones individuales se explicarán en el apartado de estadística. Los resultados de este análisis preliminar son los que determinaron la continuación del estudio.

5. ESTUDIO COMPLETO DE ASOCIACIÓN

Se van a detallar los pasos que se siguieron para el desarrollo del estudio completo de asociación, en el que se incluyeron un mayor número de SNPs, reordenamientos genómicos y VNTRs (inserciones, deleciones y VNTRs), un mayor número de muestras de pacientes de TDAH y muestras de ADN controles sin enfermedades psiquiátricas diagnosticadas. Al mismo tiempo se plantearon nuevas variables a predecir como por ejemplo, la respuesta a tratamiento del TDAH. Este estudio se llevó a cabo con 400 muestras de pacientes de TDAH y 400 muestras de controles sanos sin enfermedades psiquiátricas.

5.1. ACTUALIZACIÓN EN LA LITERATURA DE SNPs E INCLUSIÓN DE REORDENAMIENTOS GENÓMICOS Y VNTRs

Para establecer los polimorfismos que eran más interesantes a incluir en el estudio completo, se realizó una nueva búsqueda bibliográfica más actualizada y ampliando los criterios de inclusión. Esta búsqueda se realizó a través de PubMed, como se ha descrito anteriormente. Se seleccionaron además de SNPs asociados con TDAH (fenotipos asociados y diagnóstico), también aquéllos implicados en la respuesta a tratamiento, tanto a metilfenidato como a atomoxetina y no solamente SNPs, si no que se incluyeron también reordenamientos genómicos y VNTRs.

En algunos casos se seleccionaron también polimorfismos que, aunque no se había demostrado una relación directa con el TDAH, por las vías implicadas o relación con otros trastornos se sospechaba como buenos genes candidatos a asociación. Se consideraron únicamente aquéllos SNPs y reordenamientos genómicos cuyas frecuencias alélicas habían sido validadas previamente y que eran superiores al 10% (alelo menor) en la población de origen caucásico, preferentemente. Estos requisitos, compartidos con los establecidos para la selección de SNPs para el chip de genotipado fueron imprescindibles para la inclusión, pero además se establecieron ciertos requisitos de selección para aquellos casos en los que en la bibliografía se hacía referencia al gen pero no al polimorfismo en concreto, con la intención de ampliar la búsqueda de polimorfismos de potencial interés; se eligieron en primer lugar los polimorfismos que se localizaban mayoritariamente en los exones y en las secuencias reguladoras, puesto que cambios en estas regiones podrían suponer alteraciones en las proteínas que codifican o en los niveles de las mismas y por lo tanto tener mayor repercusión que la que se asocia con regiones intrónicas. En segundo lugar, se pudieron añadir también polimorfismos localizados en intrones aunque sean aparentemente regiones en las que los cambios tendrían menor repercusión en la proteína final, pero de los que aparecían numerosas referencias en la bibliografía, ya que, por ejemplo, la asociación podría deberse a que estos polimorfismos se encuentran en desequilibrio de ligamiento con los verdaderos implicados con el trastorno, con la respuesta diferencial a fármacos, etc (Pardi et al. 2005).

5.1.1. ACTUALIZACIÓN DE SNPs

Se elaboró de nuevo una lista priorizada de SNPs candidatos de estudio acompañados del nombre del gen, el código rs y la localización cromosómica. Estos datos se muestran en la Tabla 17. A partir de esta lista, se seleccionaron 216 SNPs para ser genotipados por su asociación descrita con el TDAH o con la respuesta al tratamiento. En esta tabla no están incluidos los SNPs del gen CYP2D6 que junto con los reordenamientos de este gen fueron genotipados mediante la herramienta de genotipado PHARMAchip® y se mencionarán más adelante. Solamente se muestran los que fueron seleccionados y genotipados mediante la plataforma de Illumina y PCR competitiva.

Tabla 17.- Tabla que recoge los 216 SNPs que fueron seleccionados para genotipar por su relación con el TDAH o con la respuesta a tratamiento. No están incluidos los SNPs del gen CYP2D6 relacionados con la respuesta a atomoxetina, ya que se han descrito anteriormente en el apartado de Sujetos, Materiales y Métodos en el genotipado mediante PHARMAchip®. Se muestra el código rs de cada SNP, el gen al que pertenecen, el cromosoma (abreviado como Crom.) y la localización cromosómica (abreviado como Localizac.) de cada uno de ellos.

| Gen | código rs | Crom | Localizac. | Gen | código rs | Crom | Localizac. |
|-------------|------------|------|------------|------------|------------|------|------------|
| CSMD2 | rs2281597 | 1 | 34132445 | DBH | rs1611115 | 9 | 135490336 |
| LOC128322 | rs11590090 | 1 | 113115086 | | rs2519152 | 9 | 135499455 |
| NGFB | rs6330 | 1 | 115630836 | hCG1818231 | rs16928529 | 10 | 72652991 |
| TGFB2 | rs1018040 | 1 | 216772437 | CDH23 | rs11594082 | 10 | 72969259 |
| MYT1L | rs2241685 | 2 | 1905000 | NRG3 | rs17746658 | 10 | 84561249 |
| OXER1 | rs930421 | 2 | 42834743 | TLL2 | rs10786284 | 10 | 98125495 |
| | rs6719977 | 2 | 42839307 | C10orf79 | rs515910 | 10 | 105956394 |
| TACR1 | rs3771829 | 2 | 75217653 | ADRA2A | rs1800544 | 10 | 112826493 |
| | rs3771856 | 2 | 75267522 | | rs553668 | 10 | 112829569 |
| CTNNA2 | rs13395022 | 2 | 79735768 | DRD4 | rs1800955 | 11 | 626784 |
| MGC33657 | rs2587695 | 2 | 120038287 | KCNC1 | rs3893215 | 11 | 17721406 |
| hCG_2045614 | rs4241112 | 2 | 122378682 | NAV2 | rs874426 | 11 | 19526139 |
| NAP5 | rs7577925 | 2 | 133756989 | BDNFOS | rs6265 | 11 | 27636492 |
| CRYGC | rs2242073 | 2 | 208702290 | FADS1 | rs174548 | 11 | 61327924 |
| KIAA1486 | rs1517484 | 2 | 225946154 | FADS2 | rs498793 | 11 | 61381281 |
| LOC389101 | rs9845475 | 3 | 32817105 | | rs174611 | 11 | 61384457 |
| MOBP | rs864643 | 3 | 39530584 | NTF3 | rs4074967 | 12 | 5470727 |
| FHIT | rs6791644 | 3 | 60746148 | | rs6332 | 12 | 5473893 |
| FOXP1 | rs17651978 | 3 | 71103180 | | rs6489630 | 12 | 5474885 |
| C3orf21 | rs3892715 | 3 | 196239299 | | rs7956189 | 12 | 5476122 |
| DRD5 | rs2227847 | 4 | 9393491 | GRIN2B | rs2284407 | 12 | 13733473 |
| KCNIP4 | rs876477 | 4 | 20766026 | | rs2284411 | 12 | 13757439 |
| CLOCK | rs1801260 | 4 | 55996126 | | rs2300256 | 12 | 13759677 |
| EREG | rs1350666 | 4 | 75443454 | | rs2268115 | 12 | 13760992 |
| MGC48628 | rs12505502 | 4 | 91787046 | ITPR2 | rs3782309 | 12 | 26750663 |
| DAT1 | rs27072 | 5 | 1447522 | PTHLH | rs708188 | 12 | 28111983 |
| | rs11564774 | 5 | 1447600 | TPH2 | rs4570625 | 12 | 70618190 |
| | rs1042098 | 5 | 1447815 | | rs4565946 | 12 | 70623036 |
| | rs40184 | 5 | 1448077 | | rs1386493 | 12 | 70641446 |

| Gen | código rs | Crom | Localizac. | Gen | código rs | Crom | Localizac. |
|-----------|------------|------|------------|-----------|------------|------|------------|
| DAT1 | rs11133767 | 5 | 1454580 | TPH2 | rs1386497 | 12 | 70678557 |
| | rs28364997 | 5 | 1456128 | SYT1 | rs2037743 | 12 | 78135505 |
| | rs6347 | 5 | 1464412 | NT5DC3 | rs4964805 | 12 | 102716954 |
| | rs10040882 | 5 | 1471558 | NOS1 | rs478597 | 12 | 116235808 |
| | rs2975292 | 5 | 1472932 | LOC729825 | rs17079773 | 13 | 23496384 |
| | rs11564758 | 5 | 1473588 | DCLK1 | rs1539549 | 13 | 35349881 |
| | rs250686 | 5 | 1478159 | HTR2A | rs6314 | 13 | 46307035 |
| | rs463379 | 5 | 1484164 | | rs7322347 | 13 | 46308104 |
| | rs460000 | 5 | 1485825 | | rs7997012 | 13 | 46309986 |
| | rs403636 | 5 | 1491354 | HTR2A | rs6561333 | 13 | 46318313 |
| | rs2617605 | 5 | 1495521 | | rs7984966 | 13 | 46327447 |
| | rs2937639 | 5 | 1496728 | | rs6313 | 13 | 46367941 |
| | rs2975226 | 5 | 1498616 | GPC6 | rs7995215 | 13 | 93206507 |
| LOC728594 | rs2652511 | 5 | 1499389 | FLJ43390 | rs1514928 | 14 | 61748056 |
| | rs2550956 | 5 | 1500841 | MEIS2 | rs8041675 | 15 | 35129894 |
| | rs3756450 | 5 | 1501148 | RORA | rs922781 | 15 | 58857636 |
| LPCAT1 | rs12652860 | 5 | 1506772 | ITGA11 | rs7164335 | 15 | 66502086 |
| SLC1A3 | rs3776581 | 5 | 36697701 | IL16 | rs7172689 | 15 | 79320750 |
| | rs2269272 | 5 | 36723613 | | rs4128767 | 15 | 79330462 |
| | rs2032893 | 5 | 36734379 | MAN2A2 | rs2677744 | 15 | 89251445 |
| MAP1B | rs2199161 | 5 | 71446112 | SLCO3A1 | rs7495052 | 15 | 90353033 |
| REEP5 | rs469727 | 5 | 112270867 | LOC390641 | rs7175404 | 15 | 91837692 |
| ADRB2 | rs1042714 | 5 | 148186666 | GRIN2A | rs8049651 | 16 | 9851167 |
| ADRB2 | rs1042718 | 5 | 148187110 | SLC6A2 | rs28386840 | 16 | 54244319 |
| | rs1042719 | 5 | 148187640 | | rs3785143 | 16 | 54252607 |
| KCNIP1 | rs1541665 | 5 | 170075495 | | rs3785157 | 16 | 54287337 |
| | rs17673653 | 5 | 170099172 | | rs5569 | 16 | 54289336 |
| DRD1 | rs686 | 5 | 174801306 | | rs998424 | 16 | 54289447 |
| | rs4532 | 5 | 174802756 | CES1 | rs71647871 | 16 | 54415071 |
| ADAMTS2 | rs9687070 | 5 | 178501755 | CNTNAP4 | rs13330107 | 16 | 75436363 |
| | rs10039254 | 5 | 178503520 | CDH13 | rs7187223 | 16 | 81015234 |
| | rs3776816 | 5 | 178507474 | | rs11646411 | 16 | 81304438 |
| GFOD1 | rs552655 | 6 | 13478467 | | rs6565113 | 16 | 81665147 |
| MBOAT1 | rs1202199 | 6 | 20264153 | ATP2C2 | rs10514604 | 16 | 83003885 |
| TFEB | rs2842643 | 6 | 41758714 | ITGAE | rs220470 | 17 | 3611724 |
| SUPT3H | rs3799977 | 6 | 44945334 | ARRB2 | rs7208257 | 17 | 4567246 |
| HTR1B | rs6296 | 6 | 78228979 | | rs1045280 | 17 | 4569387 |
| SH3BGR2 | rs1062793 | 6 | 80468115 | PEMT | rs7946 | 17 | 17350285 |
| CNR1 | rs806368 | 6 | 88906819 | | rs897453 | 17 | 17366356 |
| | rs12720071 | 6 | 88907900 | SLC6A4 | rs1042173 | 17 | 25549137 |
| | rs1049353 | 6 | 88910354 | | rs6354 | 17 | 25574024 |
| MAP3K7 | rs806276 | 6 | 91264072 | | rs2066713 | 17 | 25575791 |
| LOC729293 | rs9451437 | 6 | 91266607 | LOC728073 | rs12453316 | 17 | 69027654 |
| | rs6570426 | 6 | 141239039 | DSC3 | rs2678787 | 18 | 26436326 |
| SNX9 | rs9389835 | 6 | 141312353 | RAB27B | rs2311120 | 18 | 50628121 |
| | rs2770112 | 6 | 158117157 | NEDD4L | rs4149601 | 18 | 53967789 |

| Gen | código rs | Crom | Localizac. | Gen | código rs | Crom | Localizac. |
|-----------|------------|------|------------|-----------|------------|------|------------|
| CREB5 | rs2237349 | 7 | 28729488 | DSEL | rs13353224 | 18 | 63551405 |
| NEUROD6 | rs10238918 | 7 | 31343894 | NUCB1 | rs9676447 | 19 | 54116059 |
| | rs2233404 | 7 | 31345458 | ZNF805 | rs2014572 | 19 | 62451830 |
| DDC | rs11238131 | 7 | 50506083 | ZNF544 | rs260461 | 19 | 63462695 |
| | rs6592961 | 7 | 50540384 | SNAP25 | rs6077690 | 20 | 10145461 |
| | rs1982406 | 7 | 50565121 | | rs362567 | 20 | 10194091 |
| | rs2044859 | 7 | 50580056 | | rs363006 | 20 | 10228083 |
| | rs11765748 | 7 | 50583110 | | rs3787283 | 20 | 10232418 |
| | rs17133878 | 7 | 50588421 | | rs3746544 | 20 | 10235084 |
| IMMP2L | rs6968385 | 7 | 109834707 | MMP24 | rs1555322 | 20 | 33312595 |
| LOC393078 | rs10227331 | 7 | 156987699 | SULF2 | rs4810685 | 20 | 45834120 |
| LPL | rs7816032 | 8 | 19831171 | CHRNA4 | rs6090378 | 20 | 61445822 |
| ADRA1A | rs17426222 | 8 | 26773734 | | rs1044396 | 20 | 61451578 |
| | rs4732682 | 8 | 26776810 | | rs2229959 | 20 | 61451998 |
| | rs573514 | 8 | 26777198 | | rs1044394 | 20 | 61452529 |
| | rs3808585 | 8 | 26780243 | | rs6011776 | 20 | 61454200 |
| TRPS1 | rs17658378 | 8 | 116463251 | | rs2273505 | 20 | 61461322 |
| LOC729628 | rs307415 | 8 | 142682236 | GRIK1 | rs363512 | 21 | 29972688 |
| NAPRT1 | rs2290416 | 8 | 144728743 | C21orf33 | rs968714 | 21 | 44378024 |
| DMRT2 | rs17641078 | 9 | 1046959 | COMT | rs6269 | 22 | 18329952 |
| SLC1A1 | rs10974610 | 9 | 4530588 | | rs4818 | 22 | 18331207 |
| PTPRD | rs1975197 | 9 | 8836955 | COMT | rs4680 | 22 | 18331271 |
| | rs4626664 | 9 | 9251737 | PPM1F | rs412050 | 22 | 20637519 |
| CNTFR | rs1124882 | 9 | 34544227 | LOC729980 | rs13057533 | 22 | 28940731 |
| | rs1080750 | 9 | 34571525 | LOC441996 | rs130575 | 22 | 33189793 |
| | rs7036351 | 9 | 34582699 | STS | rs12861247 | X | 7184199 |
| NTRK2 | rs7816 | 9 | 86620341 | MAOA | rs6323 | X | 43475980 |
| | rs11795386 | 9 | 86792718 | | rs3027399 | X | 43477666 |
| | rs1387926 | 9 | 86822483 | MAOB | rs1799836 | X | 43512943 |
| | rs1586681 | 9 | 86837254 | | rs5906213 | X | 43654659 |
| ASTN2 | rs10983238 | 9 | 118373504 | SYP | rs3817678 | X | 48934269 |
| DNM1 | rs2502731 | 9 | 130016378 | CACNA1F | rs5906754 | X | 48947171 |
| C9orf98 | rs11243897 | 9 | 134608104 | AR | rs6152 | X | 66682352 |

De los SNPs seleccionados y descritos en la Tabla 17 se ha publicado una posible asociación con la respuesta a metilfenidato para los SNPs con código rs; rs3746544, rs5569, rs4680, rs1800544, rs7164871, por lo que para estos SNPs se analizó también su posible asociación con la respuesta a este fármaco.

5.1.2. INCLUSIÓN DE REORDENAMIENTOS GENÓMICOS Y VNTRs

Del mismo modo que con los SNPs, en base a la revisión bibliográfica se elaboró una lista con los cuatro reordenamientos que se consideraron más relevantes para el estudio: dos asociados a TDAH y dos con la respuesta a MTF. Se muestran en la Tabla 18 y todos ellos fueron detectados mediante el kit de detección de reordenamientos genómicos y VNTRs. La inserción de SLC6A4 además de con el TDAH, en combinación con el alelo de 7 repeticiones (7R) de la VNTR de DRD4 se han asociado con una peor respuesta a MTF.

Tabla 18.- Tabla que recoge las características de los cuatro reordenamientos que fueron seleccionados para su genotipado e inclusión en el Kit de detección de reordenamientos genómicos y VNTRs. Para cada uno de ellos se describe el gen, el tipo de reordenamiento y número de repeticiones, la posición, el tamaño, si ha sido asociado a TDAH (marcados en verde claro) o si han sido asociados a respuesta a metilfenidato (marcados en blanco) y las principales referencias bibliográficas que apoyan esa asociación.

| Reordenamiento | Posición | Tamaño | Asociación | Bibliografía |
|---------------------------------------|---|--------|---|---|
| DRD4: Inserción/delección | Promotor (-1479, -1240) a 1.2kb del inicio de la transcripción. | 120 pb | TDAH | McCracken et al. 2000; Kustanovich et al. 2004 |
| SLC6A4: Inserción/delección | Promotor a 1kb del inicio de la transcripción | 44 pb | TDAH y en combinación con el alelo 7R de DRD4, respuesta a MTF. | Langley et al. 2003 |
| DAT1: VNTR (3-11R) | 3' no traducida | 40 pb | Respuesta a MTF | Mick et al. 2006; Stein et al. 2005; Stein y McGough 2008; Kirley et al. 2003 |
| DRD4: VNTR (2-11R) | exón 3 | 48pb | Respuesta a MTF | Ding et al. 2002; Kirley et al. 2004; Kustanovich et al. 2004 |

5.1.3. CITOCROMO P450 ISOFORMA 2D6 (CYP2D6)

Analizar los numerosos SNPs, así como la duplicación y delección completas del gen CYP2D6 resulta esencial para predecir la respuesta a ATX, ya que como se ha comentado en la Introducción, la ATX es metabolizada por esta isoforma del citocromo P450. Sin embargo, la complejidad del análisis de las diferentes combinaciones de las variantes alélicas de este gen suponía un problema para su genotipado.

Debido a un gran número de SNPs a genotipar (216), a la inclusión de reordenamientos genómicos y VNTRs y al análisis complejo de los resultados del genotipado del gen CYP2D6, además de a la inclusión de un mayor número de muestras (800 en total), se plantearon nuevas estrategias de genotipado diferentes a las del estudio piloto. Para los SNPs, se seleccionó la plataforma de genotipado GoldenGate[®] por su rapidez y alta capacidad de genotipado.

Sin embargo, existe un pequeño número de SNPs que por cuestiones técnicas no podían ser genotipados por esta técnica, por lo que se recurrió al Ensayo KASPar[®] en estos casos. En relación a los reordenamientos genómicos y VNTRs se decidió poner a punto un kit de detección específico para estos polimorfismos. Y finalmente para el CYP2D6 se seleccionó el kit PHARMAchip[®].

A continuación y antes de describir la preparación de las muestras y cada uno de los procesos de forma independiente y sus requerimientos, en la Tabla 19 se muestra un resumen de las cuatro técnicas de genotipado elegidas y qué tipo de polimorfismos se han analizado con cada una de ellas.

Tabla 19.- Tabla que resume las cuatro técnicas de genotipado que se han empleado en el desarrollo del estudio completo de asociación para genotipar todos los polimorfismos de interés.

| Técnica | Polimorfismos genotipados |
|--------------------------------|---|
| Ensayo GoldenGate [®] | SNPs asociados a TDAH y a respuesta a MTF |
| Ensayo KASPar [®] | SNPs que no pudieron ser genotipados mediante el Ensayo GoldenGate [®] |
| PHARMAchip [®] | SNPs, inserciones y deleciones del CYP2D6 (respuesta a ATX) |
| Kit reordenamientos | Reordenamientos genómicos y VNTRs asociados a TDAH y a respuesta a MTF |

5.2. AMPLIFICACIÓN DEL ADN GENÓMICO

La cantidad de ADN obtenida de las muestras proporcionadas por la mayoría de los centros colaboradores y las concentraciones y volúmenes obtenidas de los biobancos, fueron insuficientes para las técnicas de alta capacidad de genotipado que se propusieron, y por lo tanto, para poder genotipar los polimorfismos en este estudio. Por esta razón fue necesario recurrir a una estrategia de amplificación para poder conseguir una gran cantidad de DNA a partir de pequeños volúmenes de DNA genómico.

Para ello se empleó la tecnología denominada WGA (*Whole Genome Amplification*) empleando el *GenomiPhi V2 Amplification Kit*. Este kit permite obtener cantidades superiores a 40 µg de DNA genómico a partir de muestras de 10 ng de DNA siendo la longitud de los productos superior a 10 kb. Describiendo la técnica brevemente, el ADN se desnatura mediante calor y después se enfría para mantener la doble hebra de ADN abierta. El reactivo *sample buffer* contiene hexámeros de nucleótidos (*random hexamers*) que se unen al azar al ADN molde. El *master-mix* que contiene la ADN polimerasa, hexámeros, nucleótidos, sales y otros buffers se añade al ADN molde y la mezcla se incuba a 30°C durante una hora y media (tiempo suficiente para alcanzar el máximo rendimiento de amplificación). Tras la amplificación, la

enzima se inactiva a 45°C durante 10 minutos. Todo este proceso se ha llevado a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 9700. Posteriormente se cuantificaron todas las muestras mediante un fluorímetro del tipo Qubit™ Fluorometer para asegurar que la reacción ha sido exitosa y para conocer la concentración de cada muestra. Posteriormente, se ajustaron los volúmenes y concentraciones a las requeridas para cada técnica de genotipado.

5.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA SU GENOTIPADO

Para el genotipado de las muestras mediante el ensayo GoldenGate® en el caso de ADN amplificado se requieren al menos 50 ng si el ADN está intacto. Si se sospecha que ha habido degradación esta cantidad asciende a 100-200 ng, siendo esta cantidad independiente del número de SNPs que se quieran genotipar.

Para el genotipado de las muestras mediante el ensayo KASPar®, éstas deben tener una concentración de al menos 14 ng/μl y un volumen de 0,75 μl por SNP a genotipar si son ADN amplificado con un volumen extra de 5 μl en total.

Para el genotipado de las muestras mediante el Kit de detección de reordenamientos genómicos y VNTRs y PHARMAchip® se requiere tener el ADN a una concentración de al menos 20 ng/ul y un volumen que variará según el número de reacciones de PCR que se desarrollen. En el caso de PHARMAchip®, el ADN que se empleó, siempre que fuera posible, fue el original ya que para la óptima detección de la delección y duplicación del gen entero (CYP2D6) se requiere que el ADN sea de muy buena calidad.

Se prepararon las muestras a una concentración y volúmenes mayores de los necesarios para tener suficiente ADN para todos los ensayos. Las muestras se colocan de forma ordenada en placas de 96 pocillos para termociclador (Microamp® Optical 96 well reaction plates). En cada una de las placas se incluye una muestra de ADN control positivo (línea celular perteneciente a *Progenika S.A.* (código: L23) y un control negativo (agua) que se utilizarán como controles internos del proceso de genotipado y que se colocan en una posición diferente en cada placa.

5.4. ENSAYO DE GENOTIPADO GOLDENGATE®

5.4.1. ANÁLISIS DE VIABILIDAD DE SNPs

Para cada uno de los SNPs que se desea genotipar, se ha realizado el análisis de la viabilidad para su genotipado con la plataforma GoldenGate® de Illumina. Los reordenamientos genómicos y VNTRs no se pueden genotipar por esta técnica y se explicará en el apartado 5.7. como se ha realizado su genotipado.

El análisis de viabilidad es imprescindible y sirve para predecir, en función de la secuencia nucleotídica que flanquea a cada SNP y su posición en el genoma, el éxito a nivel técnico que tendrá su genotipado con Illumina. De esta forma, aquellos SNPs con baja probabilidad de ser genotipados correctamente, se sustituirán por otros SNPs en el mismo gen y que estén en el mismo bloque haplotípico (SNPs representantes del anterior) con mayor facilidad para ser genotipados, de forma que se pierda el menor número de SNPs posibles.

A nivel práctico, se envía la lista de códigos "rs" de los SNPs a Illumina (si no se conoce el código "rs", con la secuencia y posición suele ser suficiente), son evaluados y devuelven un listado de aquellos SNPs que presentan dificultades para ser genotipados. Las dificultades pueden deberse a varios motivos. A continuación se enumeran los diferentes tipos de error y las soluciones que se han tomado en cada caso concreto:

Error tipo 1: No se reconoce el código "rs" enviado. Esto puede deberse a que:

-El código "rs" del SNP se ha sustituido recientemente por otro código "rs" o número diferente. En este caso sustituimos el código "rs" antiguo por el nuevo que indica Illumina.

-Illumina no reconoce el código rs, pero éste no ha sido renovado por otro. En este caso se busca en la base de datos de SNPs del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) la secuencia nucleotídica que incluye al SNP y se envía a Illumina en vez del código "rs" para el estudio de su viabilidad.

-El SNP no es un SNP estándar de cambio de un nucleótido por otro (ej: A→G), si no que puede ser una inserción o una delección de un nucleótido. Este tipo de SNPs no se pueden genotipar con el sistema de genotipado de la plataforma Illumina. En este caso se realiza un análisis de "tag SNPs" usando la aplicación que ofrece para ello la organización Hapmap (<http://www.hapmap.org>). Un "tag SNP" es un SNP representativo de una zona del genoma con alto desequilibrio de ligamiento (probabilidad muy alta de que los alelos de los SNPs en esa zona se transmitan siempre juntos), es decir, un SNP representativo del conjunto SNPs en esa zona. Por ello, cuando aparece este error se hace una búsqueda de "tag SNPs" para el que ha dado el error y se sustituye por uno que suponga un cambio estándar de un nucleótido por otro, de forma que se pueda genotipar con Illumina y que sea representativo del SNP anterior. En caso de que no existan "tag SNPs" para el SNP con error, este tendría que ser eliminado de la lista de SNPs a genotipar con esta plataforma e intentarlo con otra tecnología.

Error tipo 2: SNPs situados a menos de 40 nucleótidos de distancia.

Debido a limitaciones técnicas de la plataforma Illumina para el genotipado, no se pueden genotipar SNPs localizados a una distancia menor a 40 nucleótidos. En este caso, en primer

lugar, utilizando la aplicación de Hapmap se ha hecho un análisis de “tag SNPs” para comprobar si los SNPs situados a menos de 40 nucleótidos están en el mismo bloque de desequilibrio de ligamiento, es decir, estarían representados el uno por el otro. En caso afirmativo, se ha eliminado el de menor importancia según criterios de la bibliografía.

Si los SNPs no están en el mismo bloque de desequilibrio de ligamiento (no se heredan de forma conjunta), pero alguno de ellos está en el mismo bloque que otro SNP ya incluido en la lista (se hereda de forma conjunta con ese SNP), se ha eliminado por estar ya representado. Si ninguno de los SNPs está en el mismo bloque de desequilibrio de ligamiento que otros SNPs de la lista se ha sustituido el de menor importancia según la bibliografía por un “tag SNP” que lo represente y situado a más de 40 nucleótidos. En el caso de que ninguno de los dos SNPs estuviese representado por ningún “tag SNP” y nos viésemos obligados a eliminar uno de la lista, se ha eliminado aquel que presenta un índice menor de viabilidad para Illumina (parámetro también proporcionado por Illumina que tiene en cuenta la capacidad de genotipar ese SNP considerando la secuencia que lo rodea) o en caso de tener el mismo índice de viabilidad, el de menor importancia como asociado a los distintos fenotipos de TDAH o distinta respuesta farmacológica según la bibliografía. Si se trata de un SNP de gran importancia se genotipará con otra tecnología.

Error tipo 3: El SNP presenta dificultad técnica para ser genotipado correctamente por la plataforma Illumina.

Cada SNP de la lista es catalogado por Illumina según su mayor o menor dificultad técnica para ser genotipado: 0= probabilidad de éxito baja, 0.5= probabilidad de éxito moderada y 1= probabilidad de éxito alta.

Para aquellos SNPs con probabilidad de éxito baja (0) se ha intentado buscar otro SNP representativo del que tiene potencial bajo de éxito, es decir, otro SNP en el mismo bloque de desequilibrio de ligamiento y que no presente dificultad técnica de genotipado con Illumina. En el caso de que un SNP concreto no estuviese representado por ningún SNP y nos viésemos obligados a eliminarlo de la lista, se comprobó previamente a eliminarlo si era un SNP con alta importancia por estar fuertemente asociado a TDAH (diagnóstico, pronóstico, tratamiento) en la bibliografía. En tal caso, para no perder información, el SNP se genotiparía por una técnica alternativa como en casos anteriores.

Error tipo 4: El SNP presenta una frecuencia alélica en población caucásica inferior a 0,05 en la base de datos de HapMap.

En los estudios de asociación, cuando un SNP presenta una frecuencia alélica inferior a 0,05 (lo porta menos de un 5 % de la población) no se suele considerar ya que la probabilidad de

encontrarlo en los sujetos de la población de estudio es muy reducida. En nuestro caso se ha situado el punto de corte en el 10% de la población, aun más restrictivo, al hacer la selección bibliográfica de los polimorfismos.

Como resultado del análisis de viabilidad, Illumina muestra la frecuencia alélica descrita en HapMap para cada SNP en la población caucásica. En el caso de que Illumina nos muestre algún SNP cuya frecuencia es inferior a 0.05 se ha comprobado su frecuencia alélica en la base de datos dbSNP del NCBI y en los artículos originales de los que se sacó el SNP, manteniéndose si es superior a 0,05, ya que HapMap puede que no esté actualizada hasta la fecha y estos artículos sea más recientes. También se revisó la frecuencia alélica para aquellos SNPs cuya frecuencia no aparecía en la base de datos HapMap.

5.4.2. PROTOCOLO DEL ENSAYO GOLDENGATE®

Previamente al desarrollo del ensayo propiamente dicho, se diseñan y sintetizan los oligonucleótidos, mediante la tecnología de síntesis de ADN Illumina Oligator® y el Software OligoDesigner®, este paso es fundamental para que el ensayo sea exitoso. La secuencia alelo-específica se diseña a una temperatura de unión del cebador óptima de 60°C, mientras que el LSO se diseña a una temperatura óptima de 57°C.

El protocolo detallado del ensayo GoldenGate de genotipado se describe en la Figura 29, pero los pasos generales que ya se han descrito en la Introducción son los siguientes: 1) Activación del DNA por unión a partículas paramagnéticas; 2) Hibridación ASOs (*Allele-Specific Oligos*) y LSO (*Locus-Specific Oligo*) con el ADN; 3) Extensión de la cadena, unión y lavados para eliminar los oligonucleótidos en exceso que no hayan hibridado; 4) Se añade la ADN polimerasa y se produce la elongación alelo específica en una reacción de PCR universal; 5) Se añade una ADN ligasa que rellena el hueco y prepara la muestra para la hibridación; 6) Hibridación en el *Beadchip*, que consiste en la hibridación de los productos de PCR marcados fluorescentemente con las microesferas del array; 7) Lectura de la fluorescencia emitida; 8) Asignación de los genotipos.

| Día 1 | | |
|--|--------------|-------------------|
| Paso | Tiempo total | Tiempo de trabajo |
| 1 Activación ADN | 2:00 h | 0:45 h |
| 2 Hibridación ASOs y LSO con el ADN | 2:30 h | 0:30 h |
| 3 Extensión, ligación y lavados | 2:00 h | 1:30 h |
| 4 PCR universal | 3:00 h | x |
| Tiempo total | 9:30 h | 2: 45 h |
| Día 2 | | |
| 5 Preparación para la hibridación | 2:00 h | 1:00 h |
| 6 Hibridación en el <i>Beadchip</i> | 14:30 h | 0:30 h |
| Tiempo total | 16:30 h | 1:30 h |
| Día 3 | | |
| 7 Lavado y secado | 0:30 h | 0:10 h |
| 8 Lectura de la fluorescencia emitida | 1:25 h | x |
| 9 Asignación de los genotipos | <0:05 h | <0:05 h |
| Tiempo total | 2:00 h | 0:15 h |
| Tiempo total de todo el proceso | 28:00 h | 4:30 h |
|  Punto opcional de parada | | |

Figura 29.-Protocolo detallado que se sigue para el genotipado de SNPs con la plataforma de Illumina Golden Gate. Se describen tanto los pasos como los tiempos asociados a cada uno de los pasos, el tiempo total que tarda el ensayo y el tiempo de trabajo real calculados para 1 técnico trabajando con una placa de 96 pocillos. Del mismo modo se indican aquéllos pasos en los que es posible detener el procedimiento sin que el resultado del experimento se vea afectado. Adaptado de Shen et al. (2005).

5.4.3. OBTENCIÓN DE LOS RESULTADOS DE GENOTIPADO MEDIANTE ENSAYO GOLDENGATE®

La obtención de los genotipos se realiza de forma automática mediante el software de genotipado GenCall que utiliza un modelo bayesiano para asignar dichos genotipos. Este programa también asigna un valor de confianza entre 0 y 1 a cada genotipo asignado. Este valor refleja el grado de separación entre los clusters de los diferentes genotipos así como la posición dentro de una muestra dentro del cluster. En la Figura 30 se muestran los gráficos de salida de este software de genotipado para cuatro SNPs. Se aprecian claramente los clusters de los 3 genotipos posibles (A/A, A/B y B/B).

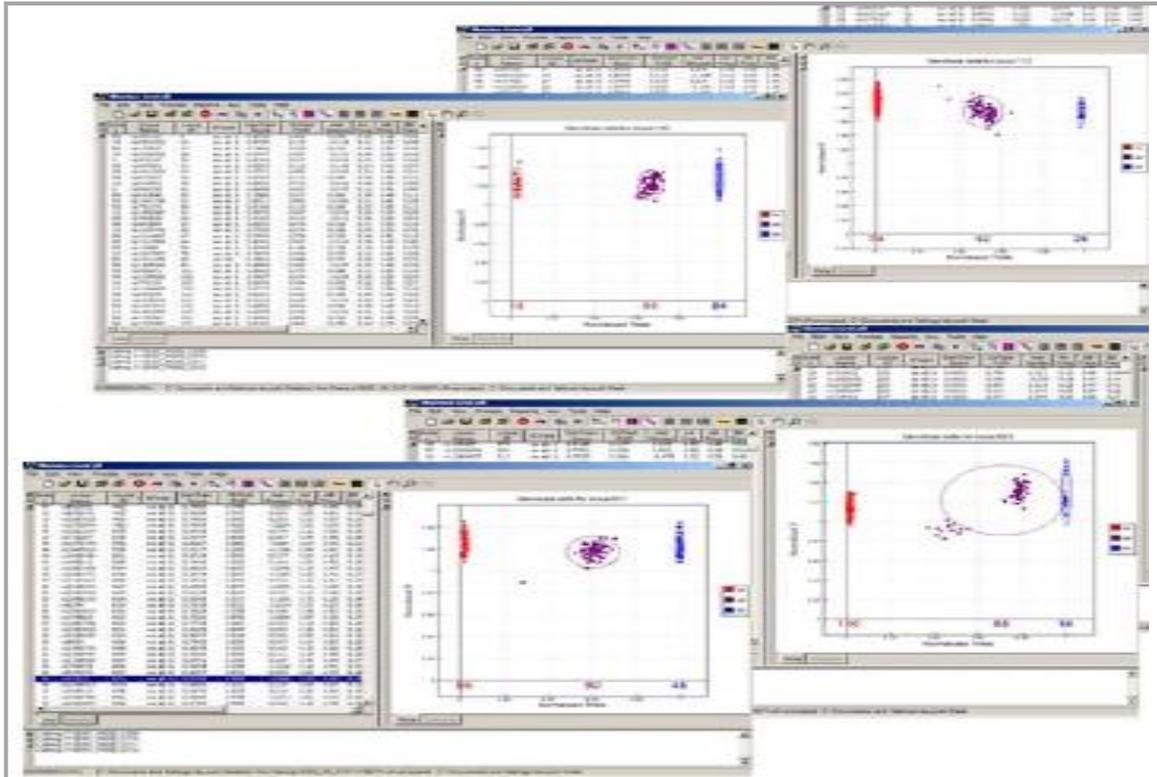


Figura 30.- Gráficos que muestra el programa GenCall para cada uno de los SNPs, en este caso cuatro. En esta representación hay 192 muestras de ADN en cada gráfico que se corresponden con cada uno de los puntos. Los valores cercanos a 0 (parte izquierda de la gráfica) se corresponderían con las muestras homocigotas para el alelo A (rojo) y las más cercanas a 1 las homocigotas para el alelo B (azul), las muestras de en medio son las heterocigotas (A/B) (morado). Adaptado de Shen et al. (2005).

A partir de este programa se extrae una base de datos con todos los genotipos ordenados para cada uno de los SNPs y muestras. Es importante señalar que existen numerosos puntos de control internos para evitar contaminaciones y/o errores de genotipado durante todo el proceso, en la unión ADN-oligo, en la PCR, en la hibridación y en el análisis de resultados.

5.5. GENOTIPADO MEDIANTE PCR COMPETITIVA (ENSAYO KASPar[®])

La técnica de genotipado que se ha elegido para los SNPs que no se pueden genotipar con la plataforma Illumina GoldenGate[®] es un sistema de genotipado por fluorescencia basado en una PCR alelo-específica competitiva como se ha descrito en el apartado de Introducción, se conoce como Ensayo KASPar[®] y ha sido desarrollado por Kbiosciences. En esta técnica no se realiza ningún análisis previo de viabilidad de los SNPs; a priori cualquier SNP es susceptible de ser genotipado mediante este ensayo.

5.5.1. SÍNTESIS Y VALIDACIÓN DE LAS SONDAS ESPECÍFICAS

El primer paso en este ensayo es el diseño de las sondas KASPar[®] específicas para cada uno de los SNPs. Se diseñaron dos oligonucleótidos alelo específicos (40 bases de longitud) y uno común (20 bases de longitud) mediante el programa Primer Picker de uso gratuito a través de la web. Previamente a comenzar el proceso de genotipado con las muestras, es necesario validar estas sondas en un panel de DNAs escogidos al azar de la población general. En esta validación se comprobará si el SNP seleccionado es polimórfico y si la sonda diseñada es adecuada para el genotipado. Si no fuera así, se diseñará una nueva sonda específica.

Durante este proceso de validación de las sondas se aplican los siguientes controles internos para que un ensayo se de por válido:

- a) que se diferencien los tres clusters correspondientes a cada uno de los genotipos
- b) que los controles de agua sean negativos
- c) que el número de genotipos asignados correctamente a su cluster sea superior al 90%
- d) que la frecuencia del alelo menor (MAF) sea mayor al 2%
- e) que el SNP se encuentre en equilibrio de Hardy-Weinberg en la población de ADNs control.

5.5.2. PROTOCOLO DEL ENSAYO KASPar[®]

La reacción de PCR se realiza a tiempo real. Este sistema de genotipado está diseñado como un ensayo multiplex que detecta ambos alelos en un único tubo de reacción con tres primers específicos para el SNP sin marcar y dos primers universales marcados con fluorescencia. Éstos últimos cebadores si no se hallan unidos al DNA molde adoptan una estructura de horquilla en donde la molécula de fluorocromo se encuentra muy próxima a un quencher que le impide la emisión de la fluorescencia. En cambio, cuando son complementarios al DNA molde, la estructura de horquilla se rompe y el fluorocromo es capaz de emitir fluorescencia que es detectada y a partir de los valores de fluorescencia recogidos se generan los clusters de los genotipos.

Generalmente se consigue una precisión mayor al 99% y se llevan a cabo también numerosos controles de calidad internos, como son:

- a) los controles de agua deben ser negativos (de lo contrario indicaría una contaminación)
- b) se coloca un ADN de genotipo conocido en cada placa en posiciones diferentes
- c) los clusters deben ser claros y separados entre sí y el porcentaje de asignación correcta a cada cluster debe ser suficiente.

5.5.3. OBTENCIÓN DE LOS RESULTADOS DE GENOTIPADO MEDIANTE ENSAYO KASPar®

Una vez que el proceso de genotipado se ha llevado a cabo y los datos de emisión de fluorescencia han sido recogidos, los resultados se visualizan utilizando el programa informático “SNPviewer software” (Kbioscience, versión 1.93) de descarga gratuita en la página web de Kbiosciences. En la Figura 31 se muestra una salida de este programa con los datos de genotipado para un SNP dado. Se observan los tres grupos genotípicos para dicho SNP (homocigoto B_B en color rojo, heterocigoto A_B en verde y homocigoto A_A en azul). Los datos de los genotipos de los SNPs también se recogen en un archivo del tipo .txt que será el que se utilice como base de datos para los análisis estadísticos de asociación que se explican en el apartado del análisis estadístico.

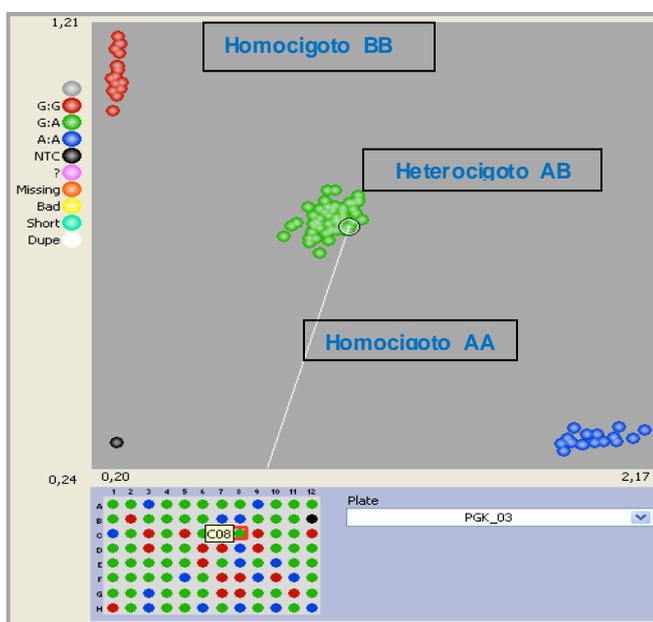


Figura 31.- Resultado graficado del genotipado mediante ensayo Kaspar correspondiente a un SNP determinado, se visualiza con el programa “SNP viewer”. Se pueden observar claramente los tres grupos para cada uno de los genotipos posibles (AA; azul, AB; verde y BB; rojo), donde cada punto representa una de las muestras hibridadas. Se obtendrá una gráfica de este tipo para cada uno de los SNPs genotipados mediante esta técnica, además de un archivo del tipo “txt” con los datos de los genotipos.

5.6. GENOTIPADO DEL CYP2D6: PHARMACHIP®

Para genotipar los polimorfismos del gen CYP2D6 asociados con la respuesta a atomoxetina se seleccionó el chip de genotipado PHARMACHIP® v3.0. Detecta las variables genéticas de CYP2D6 que se detallan en la Tabla 20. Se trata de una herramienta contrastada y que se ha empleado en diversos estudios de respuesta a fármacos (Cuyas et al. 2010).

Con esta técnica se genotiparon únicamente aquellas muestras de pacientes de los que existían datos de respuesta a atomoxetina, ya que los polimorfismos del CYP2D6 se han asociado a la respuesta diferencial a atomoxetina en el tratamiento del TDAH.

Tabla 20.- Variables genéticas del CYP2D6 que analiza PHARMAchip®.

| GEN | NOMBRE | VARIABLES GENÉTICAS ANALIZADAS |
|--------|--------------------|--|
| CYP2D6 | Citocromo P450 2D6 | *1, *2, *3, *4, *5 (delección), *6, *7, *8, *9, *10, *11, *14A, *14B, *15, *17, *18, *19, *20, *25, *29, *31, *35, *41, duplicación *1XN, *2XN, *4XN, *10XN, *17XN, *35XN, *41XN |

5.6.1. PROTOCOLO DE GENOTIPADO PHARMAchip®

El protocolo que se ha seguido para la amplificación y detección de los polimorfismos indicados en la Tabla 20 es el recomendado por Progenika Biopharma S.A. Consiste en realizar una serie de PCR multiplex, la comprobación en gel de que dos de los grupos correspondientes a la delección/duplicación del gen han funcionado correctamente, la posterior fragmentación y marcaje, hibridación y escaneado de las muestras según se detalla en la guía de uso de PHARMAchip v3.0. Solamente se realizaron las reacciones de PCR correspondientes a los grupos 3, 6 y 7 que son los que contienen las regiones de interés del CYP2D6, esta información aparece detallada en la Tabla 21. Los reactivos utilizados en todo el proceso fueron suministrados por Progenika Biopharma dentro del Pharmachip® v3.0 kit.

Las condiciones de amplificación que se utilizaron son las que se describen en la guía de uso, y se muestran en las Tablas 22 y 23. La concentración de ADN de las muestras debe tener un mínimo de concentración de 20 ng/μL, la relación A260/A280 debe estar en el rango de 1,8-2,0 y la relación A260/230 debe ser > 0,75 según las especificaciones descritas. Se añaden 5 μl de este ADN a cada grupo de PCR multiplex. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 9700.

Progenika Biopharma S.A. recomienda hacer un gel de agarosa al 1% en tampón TAE (Tris-acetato-EDTA), teñido con bromuro de etidio, de los grupos de PCR 6 y 7 para comprobar que la reacción ha funcionado. En ambas PCRs se amplifica un fragmento de gran tamaño (5 kb) y la calidad del DNA por tanto es crítica. Cualquier impureza (bien de sales o etanol) inhibirá la reacción y no se podrá obtener resultados para el CYP2D6. En la Figura 32 se muestra un ejemplo de este gel. Todas las muestras en las que se observe en gel de agarosa al menos una banda a 5 kb, se darán por válidas y se debe continuar con el paso de fragmentación y marcaje e hibridación. Sin embargo, en aquellos en los que no se detecte al menos una banda a 5kb de amplificación será necesario volver a repetir el proceso de PCR (se trata de un control de calidad del proceso). Si, además existe delección o duplicación, se verá una segunda banda de 3,5 kb.

La cubeta de electroforesis empleada fue Sistema MultiCaster Aqua Gel y el sistema de electroforesis RunOne, el tiempo de migración establecido es de 1 hora a 100 mV.

Tabla 21.- Tabla que muestra los grupos de PCR multiplex que conforman PHARMAchip asociados a los polimorfismos contenidos en las regiones amplificadas en cada PCR multiplex. En este estudio solamente se han utilizado los grupos de PCR multiplex 3, 6 y 7 que contienen los polimorfismos de CYP2D6, marcados en negrita y con el fondo en verde.

| PCR multiplex | Polimorfismos contenidos en las regiones amplificadas |
|---------------|--|
| 1 | VKORC1 -1639 C>T / CYP2C8, *3 (1196A>G) / CYP2C19 *7 (IVS5+2T>A) / HTR2A His452Tyr / CYP2C19 *8 (358T>C) / GSTT1 null allele / COMT Val108Met / CYP3A5 *9 (19386G>A) / DRD3 Ser9Gly / BCHE Ala539Thr / NAT2 481C>T / CYP2C19 *5 (1297C>T) / CYP1A2 *11 (558C>A) / BDKRB2 C-58T / TPMT G238C / CYP3A4 *1B (-392A>G) / MDR1 C3435T |
| 2 | ADRB1 Arg389Gly / CYP1A2 *1F (-163A>C) / CYP2B6 G516T / CYP2C19 *9 (431G>A) / BCHE Asp70Gly / GRIN2B C2664T / CYP2C9 *6 (818delA) / CYP1A2 *7 (3534G>A) / CYP3A5 *8 (C3699T) / AGT Met235Thr / CYP2C19 680 y G681A / CYP2C19 *4 (1A>G) / NAT2 (590, 803, 857) |
| 3 | CYP2D6 -1584 (C>G) / TYMS (6-bp deletion) / AGTR1 A1166C / ADRB2 Arg16Gly / TPMT (A719G) / ERCC2 Lys751Gln / TNF -308 G>A / CYP2C8, *2 (I269F) y *4 (792C>G) / CYP2C9 *2 (430 C>T) / DPYD*2A (IVS14+1 G>A) / MTHFR C677T / CYP3A5 *10 (T29753C) / HTR2A T102C / CYP1A1 Ile462Val / CYP3A5 *3 (6986G>A) / CYP2C19 *3 (G636A) |
| 4 | IL10 (-1082) G>A / GSTM1 null allele / CYP2C9, *3 (1075 A>C), *4 (1076 T>C), *5 (1080 C>G) / CYP2C19 *8 (358T>C) / NAT2 191G>A y 282C>T / ADD1 Gly460Trp / GSTM3*B / TPMT G460A / CYP3A5 *6 (14690 G>A) / GSTP1 Ile105Val / NAT2, 341T>C |
| 5 | ADRB1 Arg389Gly / AGT Met235Thr / CYP2C19 680 y G681A / CYP2C19 *4 (1A>G) / NAT2 (590, 803, 857) / ADRB2 Arg16Gly / NAT2 481C>T |
| 6 | CYP2D6 + delección CYP2D6 |
| 7 | CYP2D6 + duplicación CYP2D6 |

Tabla 22.- Tabla que describe los reactivos y volúmenes que se utilizaron en la amplificación de los grupos de PCR multiplex 3, 6 y 7 de PHARMAchip® v3.0.

| Reactivo | Volumen (µl/reacc) |
|----------------------|--------------------|
| GRUPO 3 | |
| PRE-Mix 3 | 7,5 µl |
| Enzyme mix A | 12,5 µl |
| Volumen final | 20 µl |
| GRUPOS 6 y 7 | |
| PRE-Mix 6 o 7 | 19 µl |
| Enzyme mix B | 1 µl |
| Volumen final | 20 µl |

Tabla 23.- Tabla que recoge el protocolo de amplificación de las PCR multiplex de PHARMachip[®] v3.0.

| PH_Multiplex PCRv3.0 | | | |
|--|-------------------|------|-----------------|
| Activación de la DNA polimerasa | | 94°C | 2 min |
| 10 ciclos | Desnaturalización | 94°C | 10s |
| | Hibridación | 60°C | 30s |
| | Extensión | 68°C | 5min |
| 25 ciclos | Desnaturalización | 94°C | 15s |
| | Hibridación | 60°C | 30s |
| | Extensión | 68°C | 5min + 5s/ciclo |
| Extensión final | | 68°C | 7min |
| Paso final | | 4°C | ∞ |

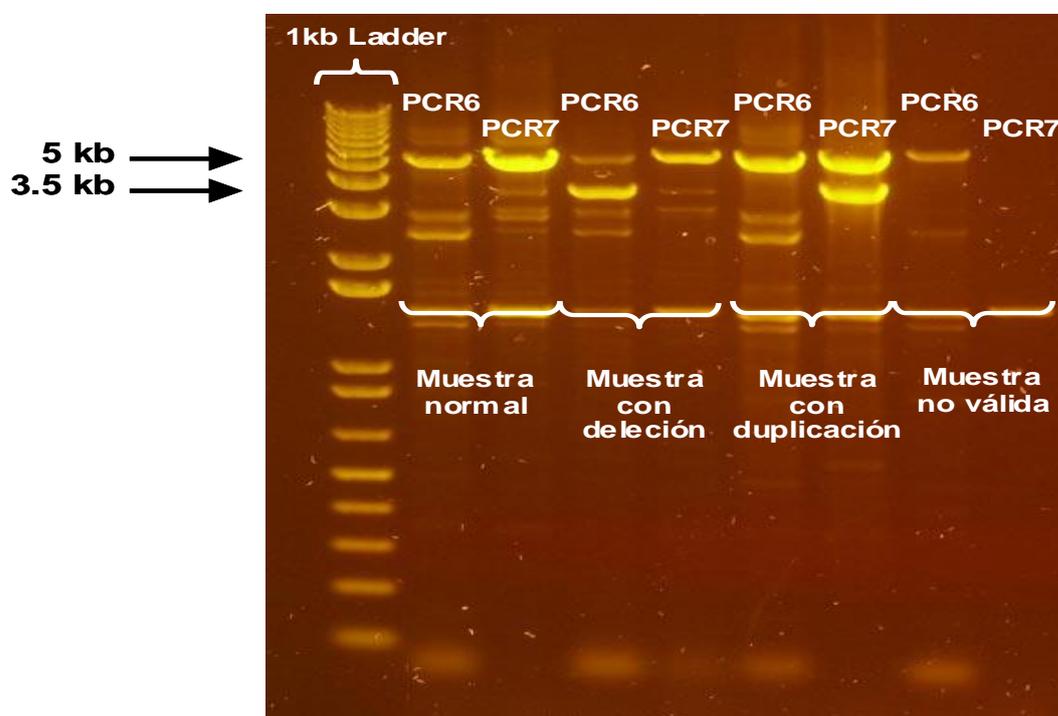


Figura 32.- Fotografía de un gel de agarosa al 1% en el que se migran los resultados de las PCRs 6 y 7 de PHARMachip[®]. En la fotografía se muestran ejemplos de una muestra normal, una con deleción, con duplicación y una muestra no válida.

A continuación, se realiza el proceso de fragmentación y marcaje de las muestras siguiendo las indicaciones de la guía. Las condiciones y reactivos de estos dos procesos se describen en la Tabla 24. Finalmente, se continúa el protocolo para la correcta hibridación y escaneado de los chips tal y como se describe en la guía de uso PHARMachip[®] v3.0.

Tabla 24.- Tabla resumen de las condiciones de fragmentación y marcaje utilizadas en el PHARMAchip[®], adaptadas de la guía de uso de PHARMAchip v3.0.

| Reactivos Fragmentación | Volumen (μl) |
|----------------------------|------------------|
| H2O Milli-Q | 30,8 μl |
| Fosfatasa alcalina (1U/μl) | 7,7 μl |
| DNAsa I (1U/μl) | 3,5 μl |
| Volumen final | 42 μl |
| PHv3.0_FRAGMENT. | |
| 37°C | 30 minutos. |
| 95°C | 10 minutos. |
| 4°C | Indefinidamente. |

| Reactivos Marcaje | Volumen (μl) |
|-----------------------|-----------------|
| 5X TdT buffer | 24,5 μl |
| CoCl2 (25mM) | 24,5 μl |
| TdT (400U/μl) | 3,5 μl |
| Biotin-11-ddUTP | 2,1 μl |
| H2O Milli-Q | 43,4 μl |
| Volumen Total | 98 μl |
| PHv3.0_MARCAJE | |
| 37°C | 60 minutos. |
| 4°C | Indefinidamente |

5.6.2. OBTENCIÓN DE LOS RESULTADOS DE GENOTIPADO MEDIANTE PHARMAchip[®]

Los resultados de las hibridaciones y de los geles se analizaron con la ayuda del software PHARMAchip v.3 desarrollado por Progenika Biopharma, a partir del cual se extrajeron los resultados de genotipos y fenotipos asociados para cada muestra. Los fenotipos que se obtienen son del tipo: metabolizador lento, intermedio, normal o intermedio, normal y ultrarrápido. Se muestra un ejemplo de una salida de este software para seis de las muestras analizadas en la Tabla 25.

Tabla 25.- Tabla ejemplo de la salida del software PHARMAchip® v3 para el CYP2D6 en 6 de las muestras analizadas. Se muestra el genotipo detectado para cada uno de los dos alelos y el fenotipo de metabolización de fármacos asociado a ese genotipo.

| MUESTRA | GENOTIPO CYP2D6 | Alelo 1 | Alelo 2 | FENOTIPO METABOLIZADOR |
|---------|-------------------|---------|---------|------------------------|
| 1 | *4/*31 | *4 | *31 | Lento |
| 2 | *1/*4 | *1 | *4 | Intermedio |
| 3 | *1/*1 | *1 | *1 | Normal |
| 4 | *1XN/*4 o *1/*4XN | *1XN | *4 | Normal o Intermedio |
| 5 | *1/*2 | *1 | *2 | Normal |
| 6 | *2XN/*2 | *2XN | *2 | Ultrarrápido |

5.7. KIT DE DETECCIÓN DE REORDENAMIENTOS GENÓMICOS Y VNTRs

Como las técnicas de genotipado anteriormente descritas no permiten la detección de reordenamientos genómicos y VNTRs, y por otro lado, está descrito en la bibliografía la asociación de algunas repeticiones en tándem de número variable (VNTRs) e inserciones de tamaño fijo tanto con el TDAH como con la respuesta a tratamiento, se decidió poner a punto una técnica que fuera capaz de detectar este tipo de polimorfismos. Esta herramienta, a la que se denominó kit de detección de reordenamientos genómicos y VNTRs, consiste en realizar una serie de PCRs específicas para cada polimorfismo en las que se marcan con fluoróforos distintos los fragmentos obtenidos y posteriormente se visualizan los resultados con la ayuda de un analizador genético capilar. En la Figura 33 se muestra un esquema de una VNTR para ayudar a la comprensión de estos polimorfismos.

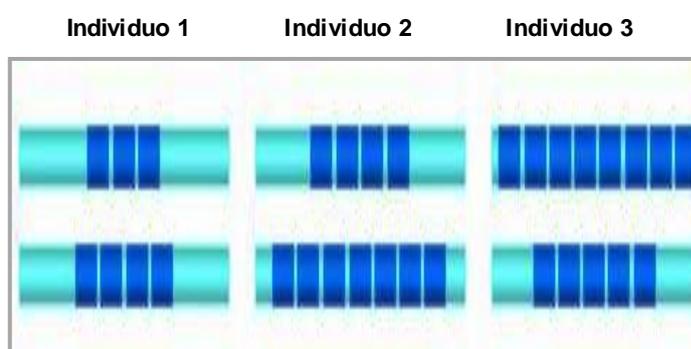


Figura 33.- Dibujo esquemático de una repetición en tándem de número variable (VNTR) en 3 individuos diferentes. Para cada sujeto se muestran los dos cromosomas homólogos y se ve cómo el número de repeticiones varía entre los diferentes sujetos. Por ejemplo el individuo 1 sería heterocigoto para la variante 3R-4R (R: repeticiones), el individuo 2 sería heterocigoto para las variantes 4R-7R y el individuo 3 también heterocigoto para las variantes 5R-8R.

5.7.1. DISEÑO DE CEBADORES ESPECÍFICOS

Tras seleccionar qué reordenamientos genómicos y VNTRs sería interesante incluir en el análisis de genotipado, se procedió a buscar la secuencia exacta y localización cromosómica de cada uno de estos polimorfismos. Esto se realizó mediante un análisis exhaustivo tanto de artículos especializados como de bases de datos electrónicas (ver direcciones en el apartado de Bibliografía). Se diseñaron cebadores específicos para amplificar los fragmentos de los genes que los contenían. Se diseñaron cuidadosamente las parejas de cebadores (un cebador directo y uno reverso) para cada fragmento de interés tal y como se ha comentado en el apartado 4.2. para el caso del chip de genotipado.

En algunas ocasiones en las que las características de los fragmentos a amplificar así lo requerían, se consultaron artículos científicos para establecer las condiciones de PCR adecuadas a cada polimorfismo e incluso para el diseño de los cebadores.

5.7.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS PCRs

La principal diferencia entre estas PCRs y la PCR estándar que se ha descrito en el apartado de Introducción, es que aquí se van a obtener productos de amplificación marcados con fluorescencia. Esto se consigue adicionando a cada pareja de cebadores unas secuencias de unas pocas bases que se denominan TAGs, y son específicas para cada fragmento. Estas secuencias hibridan específicamente con otros oligonucleótidos cortos, que también se denominan TAGs o colas y que están marcados con un fluoróforo (uno diferente para cada pareja de colas). Si se realizan PCRs uniplex se puede usar la misma secuencia de colas, marcadas con colores diferentes, para todos los fragmentos ya que la reacción de amplificación se va a producir en pocillos distintos. De esta forma los fragmentos nuevos que son sintetizados están marcados con las moléculas de fluoróforos. También se puede añadir el fluoróforo directamente a la secuencia del cebador pero a menudo esto disminuye la eficiencia con la que éste es capaz de pegarse a la hebra molde. Es importante mantener las TAGs y los productos de PCR en completa oscuridad para evitar el fotoblanqueamiento de los fluoróforos.

En primer lugar se comprobó si se producía la correcta amplificación de los productos de interés, y se ajustaron los parámetros necesarios para que así fuera. Se probó aumentando o disminuyendo el número de ciclos de la PCR, cambiando la temperatura de unión del cebador a la hebra molde, con varios diseños de primers, con distintas concentraciones de magnesio o de la taq polimerasa e incluso añadiendo DMSO a la reacción para hacerla más eficiente en regiones de ADN con estructuras secundarias con alto contenido en los nucleótidos Guanina y Citosina. En algún caso se consultó la bibliografía para poder optimizar la amplificación por PCR uniplex de todos los fragmentos de interés a analizar en el kit de detección de reordenamientos genómicos y VNTRs. Para determinar si se producía amplificación, se realizó una electroforesis, se corrieron los productos de PCR en un gel de agarosa al 2% en tampón TAE (Tris-acetato-EDTA), teñido con bromuro de etidio y mediante un transiluminador de luz ultravioleta se

comprobó que los tamaños de dichos fragmentos se ajustaban a los esperados, comparando su migración con la de un marcador de tamaño molecular. El marcador de peso molecular utilizado en los geles de agarosa fue 1 kb DNA Ladder. Para las PCRs se han utilizado los siguientes reactivos, DNA polimerasa Amplitaq[®] Gold, GeneAmp 10X PCR Buffer II, MgCl₂ 25 mM y dNTP Mix. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 9700. La cubeta de electroforesis empleada fue Sistema MultiCaster Aqua Gel y el sistema de electroforesis RunOne.

Además en todos los casos se comprobó que no existía ninguna contaminación mediante un control negativo de PCR para cada pareja de cebadores añadiendo agua en vez de ADN molde y comprobando que no se producía ninguna amplificación.

Posteriormente, se intentó agrupar las amplificaciones en una única reacción de PCR multiplex pero dadas las características especiales de ciertos de los amplicones y las diferencias en las condiciones de amplificación de cada uno de los reordenamientos no fue posible y se dejaron como PCRs independientes. Cada una de estas PCRs uniplex se marcó con un fluoróforo diferente para permitir el análisis simultáneo de todos los fragmentos obtenidos para una única muestra en el analizador genético capilar, modelo ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer. Los fluoróforos que se han usado son –FAM, -NED, -PET y –VIC y fueron sintetizados junto con la secuencia de las TAGs (con el nombre comercial de ABI PRISM[®] Primer Pairs).

El genotipado de las inserciones y VNTRs que componen el kit de reordenamientos se realiza, como se ha comentado anteriormente, mediante análisis de fragmentos en un analizador genético capilar, ya que un gel de agarosa no es lo suficientemente resolutivo para diferenciar entre algunos de los alelos posibles. En la Figura 34 se comparan las técnicas de electroforesis convencional y capilar, y se comentan las ventajas/desventajas de cada una de ellas. Este análisis, consiste básicamente en realizar una electroforesis a nivel capilar y una detección de los fragmentos inducida por láser. Se utiliza un marcador de peso molecular (GeneScan 500 ROX) para determinar el tamaño de los fragmentos y permite el análisis simultáneo de varios productos de PCR marcados con distintos fluoróforos. Los diferentes fragmentos se detectan mediante el software de análisis Peak Scanner Software v1.0.

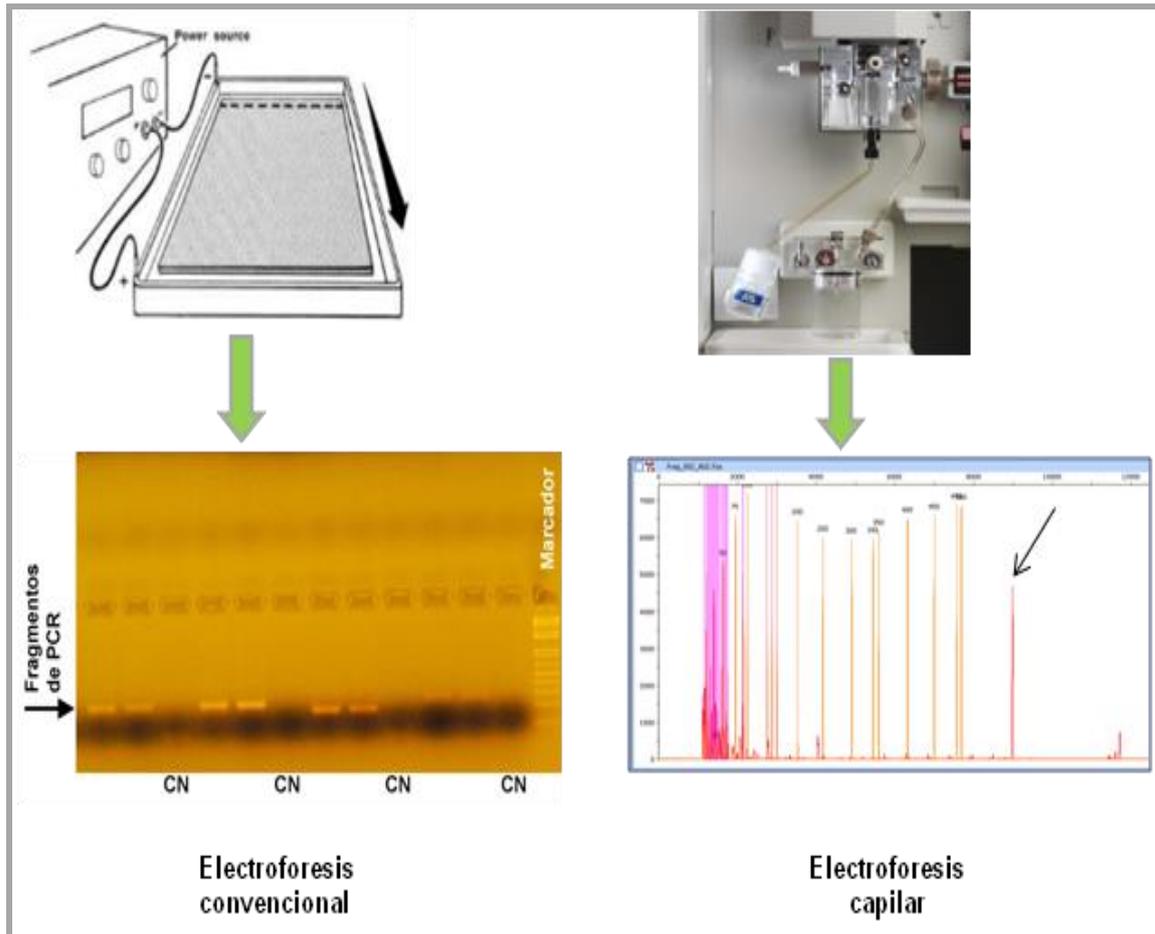


Figura 34.- Dibujo esquemático que compara una electroforesis convencional y una capilar. Ambas técnicas permiten determinar el tamaño del o de los fragmentos que se han amplificado previamente y de forma específica en la reacción de PCR. Las diferencias entre ellas se describen a continuación. **Electroforesis convencional:** Gel de agarosa/poliacrilamida de diferente concentración según el tamaño de los fragmentos que queremos analizar. Se forma una especie de malla (polímero de agarosa) por el que pasan los fragmentos de ADN en función de su tamaño cuando se aplica una carga eléctrica. El DNA tiene carga negativa por lo que al ser sometido a una diferencia de potencial migra hacia el polo positivo, de forma proporcional a su tamaño, migrando más rápido los fragmentos más pequeños. Se migra a la vez un marcador de tamaño molecular, de cuyos distintos fragmentos conocemos el tamaño y después se calcula el tamaño del fragmento de interés. Se añade bromuro de etidio al DNA antes de migrarlo, se intercala entre las bases del DNA y al ser irradiado con luz UV emite fluorescencia. Tiene el inconveniente de que es poco sensible, pero es una técnica barata y rápida. **Electroforesis capilar:** (detección fluorescente semiautomática). Es lo mismo que una electroforesis convencional pero a través de capilares muy finos. Cuando los fragmentos de ADN alcanzan la ventana del capilar, el láser excita los colorantes fluorescentes y éstos emiten fluorescencia que a su vez es recogida por el detector de longitudes de onda distintas según qué fluoróforo sea y se registra en el ordenador. Además presenta la ventaja de que, si se marcan con diferentes fluoróforos, se pueden analizar a la vez varias muestras o varias PCRs de una misma muestra. Tiene un precio más elevado que la electroforesis tradicional.

5.7.3. CONFIRMACIÓN POR SECUENCIACIÓN

Una vez se comprobó que las parejas de cebadores funcionaban correctamente se confirmaron por secuenciación todos los fragmentos amplificados y el número de repeticiones en el caso de las VNTRs. A pesar de que mediante su migración en gel de agarosa se ha comprobado que existía amplificación y que el tamaño del amplificado correspondía con el esperado, se comprueba exactamente su secuencia para evitar que se amplifique por error, por ejemplo, un gen homólogo o que se estén produciendo amplificaciones inespecíficas.

El procedimiento que se ha seguido es el mismo que se ha descrito en el apartado 4.4. para los fragmentos amplificados en el chip de genotipado y la secuencia obtenida se comparó con las secuencias recogidas en bases de datos del tipo NCBI utilizando un software del tipo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

5.7.4. OBTENCIÓN DE LOS RESULTADOS DE GENOTIPADO MEDIANTE EL KIT DE DETECCIÓN DE REORDENAMIENTOS GENÓMICOS Y VNTRs

El análisis de los resultados de genotipado del Kit de detección de reordenamientos genómicos y VNTRs ha consistido en extraer la información de los alelos para cada polimorfismo y muestra mediante el software de análisis Peak Scanner Software v1.0. En el caso de que el polimorfismo en la Bibliografía sólo apareciera asociado con la respuesta a tratamiento y no con una mayor o menor predisposición a TDAH, sólo se han genotipado las muestras de pacientes para dicho polimorfismo. Si se ha asociado con el trastorno, se han genotipado tanto las muestras de pacientes como las de controles sanos.

6. ESTADÍSTICA

6.1. FILTRADO DE MUESTRAS Y POLIMORFISMOS PREVIO AL ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Antes de proceder al análisis estadístico de los resultados de genotipos junto con las variables clínicas, es necesario filtrar los resultados, de forma que se asegure que el conjunto de polimorfismos y de muestras hayan sido correctamente genotipados. De esta forma, los resultados de los genotipos obtenidos para todos los SNPs se filtraron en base a una serie de criterios aceptados de forma estándar para este tipo de estudios de asociación genotipo-fenotipo. Los pasos que se llevaron a cabo son los siguientes:

- **ERROR DE GENOTIPADO DE SNP**

En primer lugar, se descartaron los SNPs que dieron problemas de genotipado o que no pudieron ser genotipados. Dichos SNPs son aquéllos que muestran grupos genotípicos muy próximos.

- **CALL RATE DE MUESTRA**

Posteriormente, se calculó el call-rate de todas las muestras y se eliminaron aquéllas con un call-rate <80%; es decir, muestras en las que se había genotipado con éxito menos de un 80% de los SNPs (Kim et al. 2009a). Estas muestras se descartan porque se considera que si el call-rate es <80% podría haber errores de genotipado para esa muestra.

- **CALL RATE DE SNP**

De la misma forma, se calculó el call-rate de los SNPs y se descartaron los SNPs con un call-rate <80%; es decir, SNPs que se habían genotipado con éxito en menos de un 80% de las muestras (Kim et al. 2009a), ya que se considera que si esto ocurre, el SNP pudiera no estar siendo genotipado correctamente.

- **EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG**

Se estimaron las frecuencias alélicas y genotípicas en la población control y se analizó si los polimorfismos restantes estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE); es decir, si las frecuencias de los tres genotipos para cada SNP en la población control coincidían con las esperadas. El análisis no se realiza en la población caso ó TDAH ya que se podrían descartar SNPs por no estar en HWE y en realidad ser SNPs que muestran gran asociación con la enfermedad. Las frecuencias genotípicas se estiman directamente calculando la proporción de individuos con cada genotipo. Para estimar las frecuencias alélicas simplemente se duplica la muestra tomando como unidad el cromosoma (cada individuo contribuye con 2 cromosomas, excepto en el caso de los cromosomas sexuales X e Y) y se calcula la proporción de cada alelo

(Iniesta et al. 2005). Por ejemplo si en una población de 200 individuos para un SNP concreto se observan los siguientes genotipos: 110 TT, 75 CT y 15 CC, las frecuencias genotípicas será 0.55 (110/200) TT, 0.38 (75/200) CT y 0.07 (15/200) CC. Al mismo tiempo las frecuencias alélicas serán 0.74 $([110*2]+75)/(200*2)$ para el alelo T y 0.26 $([15*2]+75)/(200*2)$ para el alelo C.

El principio de HWE determina qué frecuencias genotípicas deben observarse en la población en función de las frecuencias alélicas para cada polimorfismo. En condiciones habituales, si la transmisión de los alelos de los progenitores a los descendientes es independiente y no hay selección de alelos, la probabilidad de observar un genotipo depende del producto de las frecuencias alélicas. En el ejemplo anterior, si llamamos p a la frecuencia de T (primer alelo) y q a la de C (segundo alelo) las frecuencias esperadas de cada genotipo serán:

| TT | CT | CC |
|--------|--------|--------|
| Np^2 | $2Npq$ | Nq^2 |

Donde N es el tamaño muestral.

Estas frecuencias genotípicas esperadas se comparan con las frecuencias observadas para cada polimorfismo en el genotipado. Para realizar esta comparación, como se trata de variables categóricas (distribuidas binomialmente), se utiliza el test de chi-cuadrado de Pearson (χ^2) para todas las variables (SNPs) y se obtiene el resultado de asociación en forma de tablas de contingencia.

La **prueba χ^2 de Pearson** es una prueba no paramétrica que mide la discrepancia entre una distribución observada y la esperada, indicando en qué medida las diferencias existentes entre ambas, de haberlas, se deben al azar en el contraste de hipótesis. La fórmula que da el estadístico es la siguiente:

$$\chi^2 = \sum_i \frac{(\text{observada}_i - \text{teórica}_i)^2}{\text{teórica}_i}$$

Cuanto mayor sea el valor de χ^2 , menos verosímil es que la hipótesis nula (H_0) sea correcta. De la misma forma, cuanto más se aproxima a cero el valor de chi-cuadrado, más ajustadas están ambas distribuciones.

- Los grados de libertad **gl** vienen dados por :

$$gl = (r-1)(k-1)$$

Donde r es el número de filas y k el de columnas.

- Se acepta H_0 cuando:

$$X^2 < X^2_{t(r-1)(k-1)}$$

. En caso contrario se rechaza.

Donde t representa el valor proporcionado por las tablas, según el nivel de significación estadística elegido.

En el caso de que haya diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas podría indicar que esos SNPs no han sido correctamente genotipados.

En el caso de polimorfismos localizados en el cromosoma X, el HWE se analiza por separado en varones y mujeres, ya que si se realiza en toda la población de forma conjunta no se va a cumplir el equilibrio puesto que los varones tienen una única copia. El test para detectar la desviación del HWE se realizó utilizando el software Helix Tree versión 4.4.2. Se consideró que un SNP no estaba en HWE cuando la p del test fue $<0,0001$ en la población control (Hunt y Carrington 2008) y estos SNPs fueron eliminados del análisis.

- **SNPs MONOMÓRFICOS**

Se revisó también si los SNPs que cumplían todas estas características de genotipado eran polimórficos (presentaban más de una variante), descartándose del análisis aquéllos que fueran monomórficos (una única variante) ya que no se pueden utilizar como marcadores para el estudio de asociación por no ser informativos. A pesar de que se seleccionaron aquéllos SNPs con una frecuencia del alelo menor de al menos un 10%, puede que los datos de frecuencias alélicas recogidos en las bases de datos no correspondieran a población caucásica para algunos SNPs, y por ello en la población de estudio pueden aparecer SNPs monomórficos que es necesario descartar.

- **ANÁLISIS DE DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO**

Del mismo modo, se realizó un análisis de desequilibrio de ligamiento (**LD plot**). Este análisis se realiza con el objetivo de estudiar si existen polimorfismos que se heredan de forma conjunta, y por lo tanto representan la misma información. Se realiza un análisis de LD para todos los SNPs de un mismo cromosoma, por lo tanto se realizará un análisis por cromosoma. El análisis de LD se realizó con el software HelixTree v.4.4.2.

Si dos SNPs están en LD quiere decir que, debido a su proximidad en el cromosoma, no hay recombinación entre ellos en la meiosis y sus alelos se transmiten siempre juntos en la misma combinación en la población, al conjunto de alelos que se transmiten conjuntamente se le denomina haplotipo. Por lo tanto, la información que dan los dos SNPs como marcadores es reiterativa y para los análisis posteriores de búsqueda de modelos predictivos bastaría con incluir en la función uno de ellos como variable independiente. En la Figura 35 se muestra un ejemplo

de 2 SNPs en LD, en el caso de que el valor de correlación R^2 fuese del 100%. Se consideró que dos SNPs estaban en LD cuando el valor de R^2 de la correlación de sus genotipos es $>0,8$, límite aceptado comúnmente para considerar 2 SNPs en LD (Bosch et al. 2009).

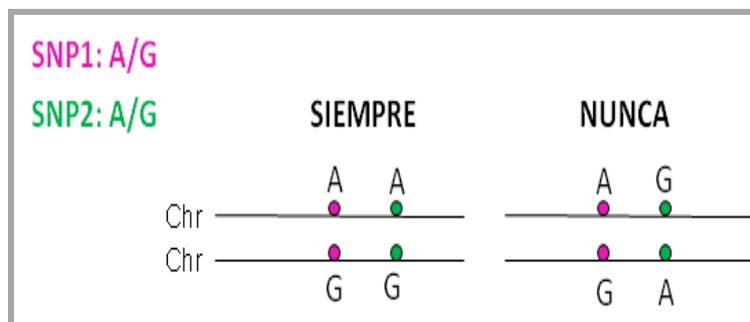


Figura 35.- Dibujo esquemático de 2 SNPs en LD a modo de ejemplo. En este caso el alelo A del SNP1 estaría ligado al alelo A del SNP2 y, por tanto, el alelo G del SNP1 al alelo G del SNP2. En la población siempre se encontrará la combinación alélica SNP1-SNP2: A-A ó G-G, considerando que el ligamiento fuese del 100% y nunca A-G.

El filtrado previo al análisis estadístico que se ha descrito fue aplicado a todos los SNPs genotipados mediante el Ensayo GoldenGate[®], KASPar[®], reordenamientos genómicos y VNTRs y el chip de genotipado, pero no en el caso de los polimorfismos genotipados mediante PHARMACHIP[®], ya que en este caso el software de análisis da directamente el fenotipo metabolizador y el análisis de asociación se ha realizado con esta salida de fenotipo. Además, para las muestras genotipadas mediante PHARMACHIP[®] si en algún caso el resultado no fue óptimo se repitió el análisis.

6.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para realizar todo el análisis estadístico que se va a describir a continuación se han utilizado los softwares de análisis SPSS v11.0 y HelixTree v.4.4.2. Entre las variables clínicas recogidas en los CRDs, se establecieron las variables predictoras y clase. Las variables sexo, antecedentes personales asociados a TDAH y antecedentes psiquiátricos se consideraron como variables predictoras, mientras que la severidad, el subtipo, la respuesta a tratamiento (MTF y ATX por separado), la comorbilidad y la normalización clínica de los síntomas se establecieron como variables clase o a predecir.

Las variables clínicas, subtipo, severidad y presencia/ausencia de comorbilidades se definieron del mismo modo que se ha comentado en la fase 2 del estudio piloto. La variable sexo se estableció en función del sexo de los pacientes y controles y la presencia de antecedentes

psiquiátricos familiares la anotó el colaborador clínico en el momento de recogida de la muestra. Por otro lado, la presencia de antecedentes personales asociados a TDAH se interroga en el CRD de la forma en que se indica en la Tabla 26 y como puede observarse en el Anexo I.

Con el objetivo de evaluar si existía o no una normalización clínica de los síntomas se decidió utilizar la puntuación obtenida en el Test DuPaul en el momento de la recogida de la muestra pero corregida por el sexo y la edad de cada paciente (DuPaul et al. 1998b). En la Tabla 27 se muestran los puntos de corte que se han utilizado para corregir la puntuación obtenida en el Test DuPaul en el momento del reclutamiento de la muestra según la versión del padre/madre de ADHD RS-IV para los menores de edad (DuPaul et al. 1998b) y según la versión autoaplicada para los mayores de edad estableciendo el punto de corte en 22 según recomendación de los colaboradores clínicos participantes en el estudio.

Tabla 26.- Tabla que muestra el campo del CRD referente a la presencia/ausencia de de antecedentes personales asociados a TDAH a rellenar por el clínico en el momento de la recogida de la muestra. Se pueden marcar uno ó más antecedentes personales simultáneamente.

| | |
|---|--|
| 1 | Familiares (Maltrato, centro de acogida, etc.) |
| 2 | Sociales (Abuso de sustancias, etc.) |
| 3 | Escolares (Fracaso, expulsión, etc) |
| 4 | Otros:..... |

La buena o mala respuesta a MTF se ha evaluado en función de la sintomatología, utilizando la variable normalización clínica de los síntomas. Se ha considerado buena respuesta si tras dos años de seguimiento existe normalización clínica de los síntomas y mala si no existe, para todos los pacientes tratados actualmente con MTF. Para aquéllos que fueron tratados en el pasado con MTF y que se les cambió el tratamiento o los que además de MTF son tratados con algún otro fármaco se ha considerado como mala respuesta.

Del mismo modo, la buena o mala respuesta a ATX se ha determinado en función de la existencia o no de normalización clínica de los síntomas en el momento de recogida de la muestra para aquellos pacientes que están siendo tratados únicamente con ATX en la actualidad. Los individuos que fueron tratados en el pasado con ATX pero que se les cambió el tratamiento por falta de respuesta o por la aparición de efectos secundarios se han considerado como mala respuesta al igual que aquéllos pacientes que además de con ATX están siendo tratados con algún otro fármaco.

Tabla 27.- Tabla adaptada de DuPaul et al. (1998b) en la que se muestran los puntos de corte para la puntuación obtenida en el test DuPaul sugeridos para determinar si existe o no sintomatología asociada a TDAH según el sexo y la edad del paciente. En la tabla se muestran las puntuaciones para los síntomas de inatención y para los de hiperactividad/impulsividad de forma separada y el valor de corte para la puntuación total, que es la que se ha tomado como referencia para clasificar a los pacientes en normalización o no normalización de los síntomas.

| Chicos | Inatención | Hiperac-impulsiv | Puntuación total | Punto de corte |
|---------------|-------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| 5-7 años | 13,6 | 14,9 | 27,5 | >27,5 no normalización |
| 8-10 años | 14,6 | 13,4 | 26,9 | >26,9 no normalización |
| 11-13 años | 16,1 | 13,1 | 28,5 | >28,5 no normalización |
| 14-18 años | 13,7 | 10,2 | 22,8 | >22,8 no normalización |
| >18 años | | | 22 | >22 no normalización |
| Chicas | Inatención | Hiperac-impulsiv | Puntuación total | Punto de corte |
| 5-7 años | 11,2 | 11,8 | 21,8 | >21,8 no normalización |
| 8-10 años | 10,7 | 9,1 | 18,8 | >18,8 no normalización |
| 11-13 años | 12,3 | 8,1 | 19,3 | >19,3 no normalización |
| 14-18 años | 10,9 | 9 | 19 | >19 no normalización |
| >18 años | | | 22 | >22 no normalización |

6.2.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO VARIABLES CLÍNICAS

En primer lugar se realizó un análisis descriptivo de las variables clínicas que se han recogido en los CRDs. Con esta información, se revisó si se disponía de los datos suficientes para el análisis de las variables clase/dependientes del estudio, que son aquellos fenotipos de interés a predecir, y que se van a valorar para buscar una posible asociación con el genotipo.

Se establecen de igual modo las variables predictoras, que serán las variables clínicas (además de los polimorfismos) que se analizarán para ver si ayudan a la predicción de las variables clase.

6.2.2. ANÁLISIS UNIVARIANTE DE ASOCIACIÓN

Desde el punto de vista estadístico, un polimorfismo constituye una variable categórica, con varios genotipos posibles y se suele considerar como categoría de referencia a uno de los grupos de individuos homocigotos (Iniesta et al. 2005).

La prueba χ^2 de Pearson que se ha descrito anteriormente, también se utiliza para analizar la asociación de dos variables categóricas entre sí, como en este caso. Para ello, se construye una tabla de contingencia y se contrasta la hipótesis. Las variables fueron por un lado cada uno de los polimorfismos genotipados y las variables clínicas predictoras y por otro cada uno de los fenotipos de interés a predecir.

En el caso de los resultados obtenidos de PHARMAchip[®] para el análisis de asociación, se utilizará el dato de fenotipo metabolizador de fármacos obtenido tras el análisis de los resultados de genotipado con el software. Esto es así ya que como se ha explicado en el apartado de Introducción, el gen CYP2D6 es un gen muy polimórfico con más de 70 variantes genotípicas pero que todas ellas dan lugar a cuatro fenotipos metabolizadores de fármacos distintos (ultrarrápido, normal, intermedio y lento) que finalmente es la información relevante acerca de cómo un individuo va a metabolizar un fármaco por esta vía.

6.2.2.1. ANÁLISIS UNIVARIANTE DE ASOCIACIÓN: SNPs

Se analizó la asociación/riesgo entre los SNPs y cada uno de los fenotipos realizando un test de alelos y un test de genotipos mediante el programa HelixTree.

Los tres modelos principales de herencia posibles que se han analizado son (Iniesta et al. 2005):

- 1) Modelo dominante.- Supone que una única copia del alelo asociado es suficiente para modificar el riesgo del fenotipo y que ser portador de dos copias lo modifica en igual magnitud. Se comparan los homocigotos para este alelo junto con los heterocigotos frente a los homocigotos para el alelo no asociado a riesgo.
- 2) Modelo recesivo.- Supone que son necesarias dos copias del alelo asociado para modificar el riesgo del fenotipo. En este caso la comparación es al revés que en el modelo dominante. Se comparan a los homocigotos del alelo de riesgo versus los heterocigotos y homocigotos del alelo no asociado a riesgo.
- 3) Modelo aditivo.- Supone que cada copia del alelo asociado modifica el riesgo del fenotipo de forma aditiva (en escala logit); por tanto los homocigotos para dicho alelo tendrán el doble de riesgo que los heterocigotos. En este modelo se compara la combinación ponderada, donde se da peso 1 a los heterocigotos y peso 2 a los homocigotos del alelo de riesgo.

En este análisis se tuvieron en consideración los tres primeros modelos de herencia descritos, para cada uno de los SNPs. Es decir, para cada SNP se analizó el modelo dominante, modelo recesivo, modelo aditivo, además de los test de alelos y test de genotipos. Para cada uno de estos tests se calcularon los *odds ratio* (OR) o razones de probabilidades de cada genotipo

respecto de la referencia. Los OR se dan con su correspondiente intervalo de confianza del 95% (OR 95% I.C.). Se calculó también el valor de p para cada asociación sin y con corrección por test múltiple (corrección de Bonferroni), situando el punto de corte en un valor de $p < 0,1$ ya que no se quería restringir demasiado el análisis. Si se utilizara un valor de $p < 0,05$ podrían dejarse de incluir en el análisis multivariante variables que a pesar de mostrar una débil asociación al fenotipo a nivel univariante, podrían ser estadísticamente significativas a nivel multivariante.

La corrección de Bonferroni es un ajuste estadístico para permitir comparaciones múltiples y evitar que salgan asociaciones significativas por azar. La corrección de Bonferroni se aplica dividiendo los valores de p por el número de resultados que se esté ensayando, es decir, recalcula el valor de p estadísticamente significativo teniendo en cuenta el número de variables testadas.

6.2.2.2. ANÁLISIS UNIVARIANTE DE ASOCIACIÓN: VARIABLES CLÍNICAS

Se analizó la asociación entre las variables clínicas predictoras y los fenotipos a predecir/variables clase mediante el test de la χ^2 en SPSS ya que todas las variables eran categóricas (si hubieran existido variables continuas habría sido necesario realizar un test ANOVA). El valor de p por debajo del cual se consideró que existía significación estadística entre las variables fue de 0,05 ya que este valor es el que se utiliza habitualmente en este tipo de análisis. Aunque se realizó este análisis previo, posteriormente en los modelos se incluyeron todas las variables significativas con un valor $p < 0,1$, ya que como se ha explicado anteriormente, podrían ser significativas a nivel multivariante.

6.2.3. ANÁLISIS MULTIVARIANTE

Una vez que se identificaron los SNPs y variables clínicas más significativos mediante el análisis univariante ($p < 0,1$), se estudió si se comportaban como predictores independientes y entraban en los modelos multivariantes. Para ello se construyeron modelos o funciones de probabilidad mediante regresión logística.

La regresión logística es un modelo de regresión para variables dependientes categóricas útil para modelar la probabilidad de un evento (fenotipo de interés) en función de otros factores o variables independientes (variables predictoras que pueden ser cualitativas o cuantitativas). Se crean variables con subvariables/subcategorías si la covariable cualitativa no es dicotómica. En el caso de los SNPs que presentan las tres categorías genotípicas, homocigoto del alelo mayor (generalmente codificado como 2), heterocigoto (generalmente codificado como 1) y homocigoto del alelo menor (generalmente codificado como 0) se crean dos subvariables/subcategorías. Se considera como referencia al genotipo codificado como 0 y se crean las siguientes variables: 2 vs 0 y 1 vs 0. Aquéllos SNPs con la frecuencia del alelo menor (MAF) baja presentan solamente dos categorías genotípicas (homocigoto del alelo mayor y heterocigoto), generándose en este caso un única subvariable: 2 vs 1.

Los modelos de regresión logística permiten dos finalidades:

1) Cuantificar la importancia de la relación entre cada una de las covariables y la variable dependiente (y conocer por tanto el OR para cada variable).

2) Clasificar individuos dentro de las categorías de la variable dependiente (presencia/ausencia), según la probabilidad que tenga de pertenecer a una de ellas dada la presencia de determinadas covariables.

La función de probabilidad en un modelo de regresión logística es de tipo exponencial permitiendo su transformación logarítmica (logit) el uso como una función lineal, su ecuación es la siguiente:

| | | |
|---------------------|---|---|
| Probabilidad | = | $\frac{1}{1+e^{-(b1.sexo+b2.SNP1+b3.SNP2...+cte)}}$ |
|---------------------|---|---|

Se modela la probabilidad de por ejemplo padecer TDAH en función de varios factores o variables independientes, que se corresponden con los que aparecen de exponente en el denominador de la ecuación. El coeficiente b de la ecuación que acompaña a cada uno de los factores que influyen en la probabilidad cuando se trata de un factor dicotómico está directamente relacionado con el OR de ese factor.

| |
|--------------------|
| $OR_i = \exp(b_i)$ |
|--------------------|

El OR cuantifica el riesgo que representa poseer el factor correspondiente respecto a no poseerlo, suponiendo que el resto de variables permanecen constantes. Cuando la variable es numérica (ejemplo: edad), cuantifica el cambio en el riesgo cuando se pasa de un valor del factor a otro (ejemplo: b.edad) si el resto permanecen constantes. Cuando el coeficiente b de la variable es positivo se obtendrá un OR mayor que 1 y corresponde por tanto a un factor de riesgo. Por el contrario, si el valor del coeficiente b es negativo el OR será menor que 1 y se tratará de un factor de protección. Pero la correcta interpretación de este término también implica a su intervalo de confianza, como se muestra en la Tabla 28.

Tabla 28.- Tabla que muestra los parámetros para la correcta interpretación del valor de odds ratio (OR) según sus valores y los del intervalo de confianza.

| Valor odds ratio | Intervalo de confianza | | Tipo de asociación |
|------------------|------------------------|----------|---------------------------|
| | Inferior | Superior | |
| Mayor de 1 | > 1 | > 1 | Significativa, riesgo |
| Mayor de 1 | < 1 | > 1 | No significativa |
| Menor de 1 | < 1 | < 1 | Significativa, protección |
| Menor de 1 | < 1 | > 1 | No significativa |

Los pasos que se llevan a cabo en el análisis multivariante son los siguientes:

- 1) Se incluyen como variables dependientes todas las variables clínicas y SNPs seleccionados en el análisis univariante para un valor de $p < 0,10$.
- 2) Se generan modelos de regresión logística según lo que se va a explicar a continuación.
- 3) Finalmente, se selecciona el mejor modelo según los criterios que se van a describir.

6.2.3.1. DESARROLLO Y SELECCIÓN DEL MODELO

El modelo debe incluir el menor número de variables posible, explicar la mayor variabilidad de la variable dependiente y presentar una precisión mínima requerida, es decir, aplicabilidad clínica. Se debe cumplir el Principio de parsimonia postulado por Guillermo de Ockham, que dice que en igualdad de condiciones la solución más sencilla que explique un problema es probablemente la correcta (*The Cambridge Dictionary of Philosophy*) Según este principio, aunque exista más de un modelo que se ajuste a los datos observados, se debe seleccionar el modelo más simple.

Además siempre se debe tener en cuenta que el tamaño muestral sea suficiente para el número de variables dependientes que se desean testar en el modelo, ya que, si no es así, se puede producir sobreajuste de las variables independientes a la variable dependiente y por ello un modelo no replicable en otra población independiente. Por norma general se recomienda que por cada evento de la variable dependiente con menor representación haya un mínimo de 10 individuos por cada variable independiente a incluir en el modelo.

Es importante destacar que puede no existir un mejor modelo y que podría ocurrir que se obtuvieran más de un modelo con verosimilitud, ajuste y capacidad predictiva adecuada.

Entre los modelos de regresión logística se podrían destacar dos:

- 1) Razón de verosimilitud hacia delante (forward).- Este modelo incluye la variable más significativa y contrasta este modelo con el modelo sólo con la constante y si la prueba de razón de verosimilitud (RV) es significativa mantiene la variable. A continuación incluye la siguiente variable con mayor significación y repite el proceso, hasta que no quedan variables que incluir ya que no aportan significación.
- 2) Razón de verosimilitud hacia atrás (backward).- Este algoritmo al contrario que el anterior comienza incluyendo todas las variables en cada paso elimina aquella que menos contribuye a la significación del modelo, acaba cuando sólo quedan las variables que aportan significación al modelo.

Es importante destacar que aunque matemáticamente la verosimilitud aumenta conforme aumenta el número de variables del modelo, si el tamaño muestral se incrementa de igual forma, los modelos que mejor se interpretan son los más simples. Incluso hay estadísticos que permiten comparar modelos penalizando aquéllos con mayor número de variables.

En este análisis se han realizado los modelos de regresión logística RV hacia delante y RV hacia atrás, incluyendo los fenotipos como variables dependientes y las variables clínicas y SNPs como variables independientes.

6.2.3.2. INTERPRETACIÓN DEL MODELO

Previamente a extraer conclusiones de un modelo de regresión, se debe corroborar que el modelo calculado se ajusta a los datos utilizados para estimarlo. Esto se testa mediante la prueba conocida como Hosmer-Lemeshow, prueba que consiste en dividir el recorrido de la probabilidad en deciles de riesgo (por ejemplo probabilidad de padecer TDAH <0,1, <0,2 y así hasta 1) y calcular tanto la distribución de pacientes de TDAH, como de individuos sanos prevista por la ecuación y los valores realmente observados, midiendo por ello la calibración del modelo. Ambas distribuciones, la esperada y la observada se contrastan mediante una prueba de χ^2 . Si difieren significativamente, indica que el ajuste del modelo no es bueno.

Una vez que se ha llegado al modelo final y se ha analizado su ajuste, este modelo debe ser capaz de expresar algo en relación con la pregunta inicial que se planteó acerca de la variable dependiente. Normalmente la constante es de poco interés, siendo lo más relevante el coeficiente de las variables; éste representa la tasa de cambio del logit de la variable dependiente por unidad de las respectivas variables.

A continuación se van a describir una serie de conceptos necesarios para la correcta interpretación de los modelos generados:

- **Exponente β (e^β).**- Este término se ha descrito en el apartado anterior, describe el efecto del SNP/variable clínica sobre la variable dependiente. Si el valor del exponente β es mayor que 1 significa que aumenta la probabilidad de que se de el evento (factor de riesgo), pero si es menor que 1 el efecto es que disminuye la probabilidad de que se de el evento (efecto protector). e^β se podría definir como un *odds ratio* de la variable dependiente, informa de cómo influye una variable determinada sobre la variable dependiente teniendo en cuenta que se está valorando esta relación de forma conjunta con la influencia de las restantes variables, retirado el peso de las mismas.
- **Intervalo de confianza (IC).**- El intervalo de confianza se refiere a un par de números entre los cuales se estima que estará cierto valor desconocido con una determinada probabilidad de acierto, es decir son unos límites que se le dan al valor estimado y se calcula a partir de los datos de la muestra. Habitualmente se manejan valores de confianza estándar del 95% y 99%. El cálculo de intervalos de confianza puede ser útil para conocer la precisión de los índices calculados, siendo mejores cuanto más pequeños o estrechos sean.
- **Sensibilidad.**- Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo para un modelo diagnóstico, es decir, la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo. Es la capacidad del test de detectar la enfermedad (o la mala respuesta a fármacos o la variable dependiente que se cuestione). También se la conoce como Fracción de Verdaderos Positivos (FVP). Se calcula como la fracción de pacientes enfermos frente a todos los que obtienen resultado positivo en la prueba diagnóstica:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos Positivos}}{\text{Verdaderos Positivos} + \text{Falsos Negativos}}$$

- **Especificidad.**- Es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano en el caso del análisis de pacientes TDAH versus controles sanos, es decir, es la probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo. También se la conoce como Fracción de Verdaderos Negativos (FVN) y se calcula del siguiente modo:

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos Negativos}}{\text{Verdaderos Negativos} + \text{Falsos Positivos}}$$

Tanto la sensibilidad como la especificidad se utilizan para determinar la validez de un modelo. Lo ideal sería disponer de modelos de alta sensibilidad y especificidad, pero esto no siempre es posible. Se debe valorar en todo momento según el tipo de enfermedad, si existe tratamiento disponible y las repercusiones de un diagnóstico erróneo, entre otras, si se prioriza la sensibilidad o la especificidad de un modelo.

- **Área bajo la curva ROC (AUC).**- Una curva ROC (Característica Operativa del Receptor) es una representación gráfica de la sensibilidad en el eje y y el complementario de la especificidad ($1 - \text{especificidad}$) en el eje x, en la Figura 36 se muestra un ejemplo. El área bajo la curva indica la discriminación o precisión del modelo, es decir, el grado en que el modelo distingue entre individuos en los que ocurre el evento y los que no. Diferentes modelos mostrarán distintas curvas ROC, la comparación entre modelos respecto a su capacidad predictiva puede hacerse comparando el AUC, siendo las mejores curvas aquellas con el área más próxima a la unidad. Se establece como regla general que un AUC de 0,5 implica ausencia de discriminación, a partir de 0,75 existe una discriminación aceptable, entre 0,8 y 0,89 es excelente y si es 0,9 o superior se trata de una discriminación excepcional. Para predecir el punto de corte que ofrece mayor sensibilidad y especificidad se selecciona el punto inflexión de la curva ROC (tras representarla gráficamente).

También se pueden representar la sensibilidad (eje x) y especificidad (eje y) y el punto de corte óptimo coincidiría con aquél en el que se cruzaran las dos curvas.

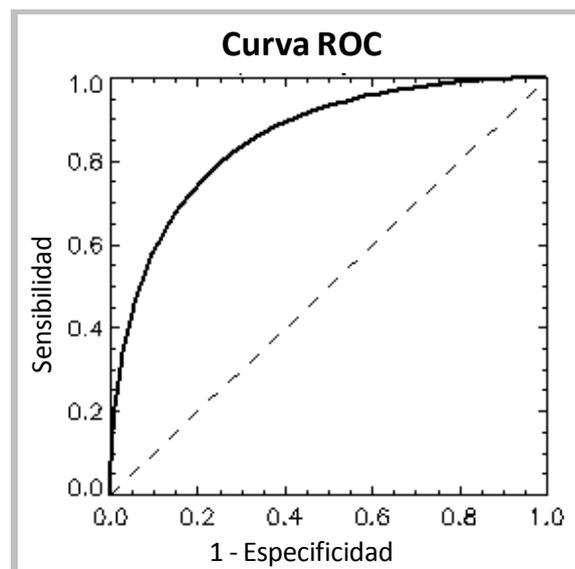


Figura 36.- Gráfica de una curva ROC con un AUC de 0,897 (discriminación excelente).

- **R² de Nagelkerke.**- Es un estadístico que cuantifica la variabilidad que es capaz de explicar el modelo, o dicho de otra forma, es la proporción de variabilidad en un conjunto de datos que el modelo estadístico es capaz de explicar. Puede tener valores entre 0 y 1, siendo el valor ideal 1, si fuera un perfecto predictor (explicaría el 100% de los casos). Es un valor de gran utilidad en la selección del mejor modelo, ya que proporciona una medida de cómo de bien va a predecir los resultados futuros el modelo estadístico.
- **Razón de verosimilitud (Likelihood Ratio, LR).**- En un modelo diagnóstico es la probabilidad de que el resultado de una prueba sea visto en un paciente con la enfermedad de interés, comparado con la probabilidad de que el mismo resultado sea visto en un paciente sin la enfermedad de interés. Cuantifican cuánto más probable es un resultado concreto (positivo o negativo) según la presencia o ausencia de la variable dependiente (por ejemplo mala respuesta a tratamiento). Existen cocientes de probabilidad para pruebas positivas y para pruebas negativas como se muestra a continuación en la fórmula. También se le conoce como razón de probabilidad o cociente de probabilidades. Ofrece la ventaja de que relaciona la sensibilidad y la especificidad de un modelo en un solo índice y al igual que éstas no dependen de la prevalencia. Por ello el LR es un índice de comparación entre diferentes modelos complementario al cálculo del AUC, los valores de este ratio deben ser interpretados según los datos que se muestran en la Tabla 29.

$$LR+ = \frac{\text{Sensibilidad}}{1 - \text{Especificidad}}$$

Tabla 29.- Tabla que muestra los valores de las tasas de probabilidad (LR+, Likelihood Ratio) en la columna de la izquierda y la probabilidad asociada a desarrollar el fenotipo pronosticado para ese valor de LR+.

| Valor de LR+ | Probabilidad de desarrollar el fenotipo pronosticado |
|--------------|--|
| ≥10 | Alta |
| 5-10 | Moderada |
| 2-5 | Ligera |
| <2 | Mínima |

En el presente trabajo, el impacto de la inclusión de los nuevos SNPs en la precisión de las funciones probabilísticas se evaluó mediante la comparación del AUC, el análisis de precisión y LR+ en puntos de corte específicos de la función para todos los modelos que se desarrollaron en función de las diferentes variables dependientes.

IV. RESULTADOS

1. ESTUDIO PILOTO

Para sondear de una forma económica la viabilidad del estudio completo de asociación, se decidió realizar el estudio piloto con las primeras 276 muestras reclutadas y los 84 SNPs seleccionados. Este estudio se llevó a cabo en dos partes diferenciadas como se ha descrito en el apartado de metodología: la primera fase el diseño y desarrollo del chip de genotipado, y la segunda fase el estudio de asociación con las muestras de los pacientes diagnosticados con TDAH.

FASE 1: DISEÑO Y DESARROLLO DEL CHIP DE GENOTIPADO

1.1. DISEÑO DE CEBADORES ESPECÍFICOS Y OPTIMIZACIÓN DE LAS PCRs INDIVIDUALES

El primer paso fue el diseño de cebadores específicos para amplificar las regiones del genoma que contenían los SNPs de interés. Aunque se seleccionaron 84 SNPs, solamente fue necesario el diseño de 75 parejas de cebadores ya que algunos de los SNPs dada su proximidad pudieron ser amplificados de forma conjunta en un mismo amplicón.

Se realizaron amplificaciones individuales con todas las parejas de cebadores diseñadas para comprobar que funcionaban correctamente con las condiciones que se definieron como óptimas y que se detallan en las Tabla 30 y 31. Se migraron los productos de PCR como se indica en el apartado de Sujetos, Materiales y Métodos.

Tabla 30.- Tabla que muestra la mezcla de reactivos establecida como óptima para las PCRs individuales para analizar la correcta amplificación de las parejas de cebadores diseñadas. Para cada fragmento se cambió únicamente la mezcla de la pareja de cebadores correspondientes manteniéndose el resto de reactivos constantes.

| Reactivo | Volumen (µl/reacc) |
|--------------------------------|--------------------|
| H2O | 13,2 |
| Buffer PCR 10x sin Mg | 2,5 |
| MgCl ₂ 25 mM | 1,5 |
| dNTPs 10 mM | 0,5 |
| AmpliTaQGold 5 U/µl | 0,3 |
| Pareja de cebadores (20 ng/µl) | 2 |
| ADN (20 ng/µl) | 5 |
| Volumen total reacción | 25 |

Tabla 31.- Tabla que recoge el protocolo de amplificación para las PCRs individuales. Se muestra al lado de cada paso del proceso, la temperatura y tiempos correspondientes.

| Protocolo PCR individuales | | | |
|--|-------------------|------|--------|
| Activación de la DNA polimerasa | | 95°C | 15 min |
| 45 ciclos | Desnaturalización | 94°C | 30 seg |
| | Hibridación | 60°C | 90 seg |
| | Extensión | 72°C | 90 seg |
| Extensión final | | 72°C | 10 min |
| Paso final | | 4°C | ∞ |

Un ejemplo de la migración en gel de agarosa para cuatro de las parejas de cebadores diseñadas puede observarse en la Figura 37 donde se muestran los resultados de amplificación de las cuatro parejas de cebadores diseñadas para la amplificación de los SNPs con códigos rs17133878 (gen DDC), rs1044394 (gen CHRNA4), rs6152 (gen AR) y rs1042718 (gen ADRB2). En algunos casos no se veía ninguna banda al realizar este procedimiento o la banda era muy débil, lo que indicaba que, o bien no se había producido amplificación o que ésta no era óptima. En ese caso se probó aumentando la concentración de los cebadores en la PCR, y si seguía sin funcionar, se diseñaban nuevas parejas de cebadores para ese SNP, hasta obtener el producto deseado con la intensidad adecuada. Las secuencias de los cebadores finales para cada uno de los SNPs se muestran en el Anexo IV.

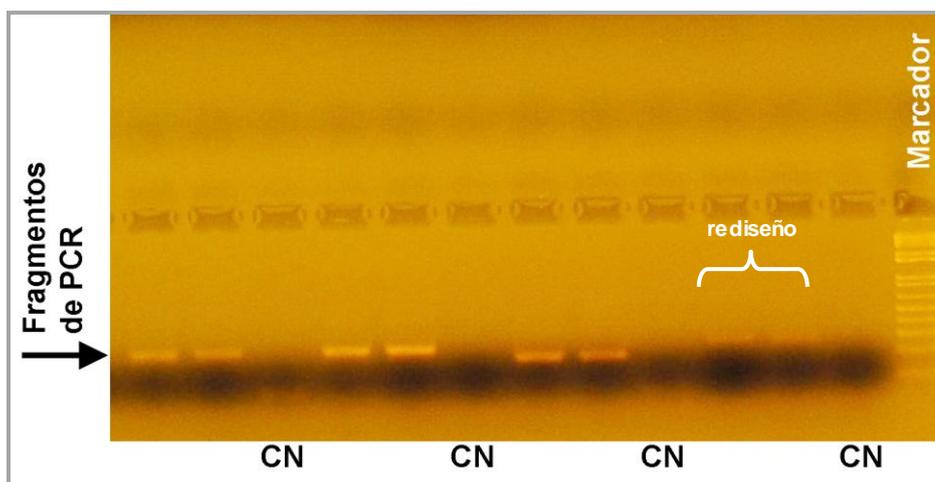


Figura 37.- Fotografía a modo de ejemplo de un gel de agarosa 2% con los productos de amplificación para cuatro de las 75 parejas de cebadores diseñadas. Se observa cómo las tres primeras parejas que amplifican los SNPs con códigos rs17133878 (207 pb), rs1044394 (215 pb) y rs6152 (202 pb) funcionaron de manera óptima, mientras que la cuarta pareja que amplifica el SNP rs1042718 (212 pb) no mostró intensidad suficiente de amplificación. Se volvió a probar aumentando la cantidad de cebadores pero no mejoró, por lo que fue necesario diseñar nuevos cebadores. Cada pareja de cebadores se testó por duplicado y con un control negativo (CN) para detectar posibles contaminaciones.

1.2. CONFIRMACIÓN POR SECUENCIACIÓN

Se comprobó mediante secuenciación que los 75 fragmentos que se amplificaron correspondían exactamente a las regiones de interés y que no se trataba de genes homólogos o se estaban produciendo amplificaciones inespecíficas. En la Figura 38 se muestra a modo de ejemplo el electroforegrama de la secuenciación del fragmento que contiene el SNP con código rs1042717 perteneciente al gen ADRB2 para un individuo heterocigoto A/G.

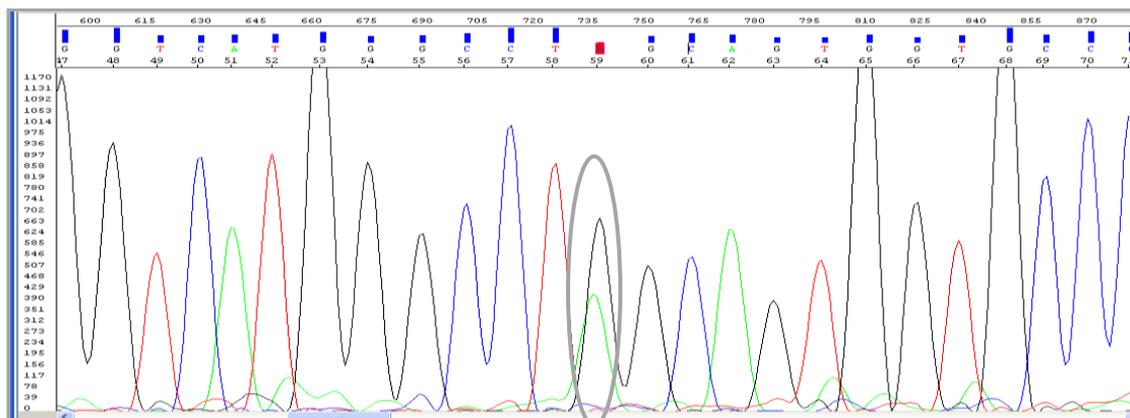


Figura 38.- Electroforegrama resultado de la secuenciación del fragmento que contiene al SNP con código rs1042717 perteneciente al gen ADRB2. En la imagen sólo se muestra el resultado de secuenciación de la región próxima al SNP de interés (el SNP está marcado con un círculo alrededor), se trata de un individuo heterocigoto A/G.

1.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS PCRs MULTIPLEX

Se establecieron las condiciones óptimas para las reacciones de PCRs multiplex del chip de genotipado. Las mezclas de reactivos establecidas y el protocolo de amplificación óptimo se muestran en las Tabla 32 y 33.

Tabla 32.- Tabla que muestra la mezcla de reactivos establecida como óptima para la amplificación de los grupos de PCR multiplex. Para cada uno de los grupos variará la mezcla de cebadores añadida manteniéndose el resto de reactivos.

| Reactivo | Volumen (µl/reacc) |
|-------------------------------|--------------------|
| Qiagen Master Mix (2X) | 12,5 |
| Mezcla de cebadores | 2 |
| Mezcla de colitas | 2 |
| H ₂ O MilliQ | 3,5 |
| ADN (20 ng/µl) | 5 |
| Volumen total reacción | 25 |

Tabla 33.- Tabla que recoge los datos del protocolo de amplificación de las reacciones de PCR multiplex que forman el chip de genotipado. Se muestran los diferentes pasos del proceso con las temperaturas y tiempos correspondientes. Todo el proceso de amplificación dura unas 4 horas.

| Protocolo PCR Multiplex chip de genotipado | | |
|--|-------------------|-------------|
| Activación de la DNA polimerasa | 95°C | 15 min |
| 45 ciclos | Desnaturalización | 94°C 30 seg |
| | Hibridación | 57°C 90 seg |
| | Extensión | 72°C 90 seg |
| Extensión final | 72°C | 10 min |
| Paso final | 4°C | ∞ |

Tabla 34.- Tablas resumen de los fragmentos que se amplifican en cada uno de los 6 grupos de PCR multiplex en los que quedaron divididos los 75 fragmentos. Para cada fragmento se indica el código rs de los SNPs que contiene y el tamaño en pb de dicho fragmento.

| GRUPO PCR MULTIPLEX 1 | | | GRUPO PCR MULTIPLEX 2 | | | GRUPO PCR MULTIPLEX 3 | | |
|-----------------------|------------------------------------|-----|-----------------------|-----------|-----|-----------------------|------------|-----|
| Frag | Código rs | pb | Frag | Código rs | pb | Frag | Código rs | pb |
| 1 | rs3785157 | 151 | 1 | rs3817678 | 151 | 1 | rs11765748 | 218 |
| 2 | rs6354 | 200 | 2 | rs2300256 | 156 | 2 | rs4570625 | 226 |
| 3 | rs2227850 | 206 | 3 | rs8914828 | 202 | 3 | rs16888561 | 234 |
| 4 | rs27072 | 213 | 4 | rs6314 | 211 | 4 | rs2293945 | 240 |
| 5 | rs4707436 | 217 | 5 | rs8049651 | 217 | 5 | rs6077690 | 257 |
| 6 | rs1042173 | 226 | 6 | rs7855914 | 226 | 6 | rs1045280 | 265 |
| 7 | rs2228673 | 241 | 7 | rs806368 | 236 | 7 | rs1042098 | 271 |
| 8 | rs806372 | 264 | 8 | rs6265 | 249 | 8 | rs2519152 | 287 |
| 9 | rs3863145 | 269 | 9 | rs1386497 | 252 | 9 | rs363006 | 294 |
| 10 | rs2284407 | 290 | 10 | rs553668 | 263 | 10 | rs6296 | 300 |
| 11 | rs806371, rs806370, rs806369 | 297 | 11 | rs3776581 | 272 | | | |
| 12 | rs1843809 | 299 | 12 | rs2284411 | 282 | | | |
| | | | 13 | rs1386493 | 294 | | | |
| | | | 14 | rs362567 | 341 | | | |

| GRUPO PCR MULTIPLEX 4 | | |
|-----------------------|-------------------------|-----|
| Frag | Código rs | pb |
| 1 | rs3787283 | 151 |
| 2 | rs6152 | 202 |
| 3 | rs4565946 | 213 |
| 4 | rs7946 | 227 |
| 5 | rs174611 | 235 |
| 6 | rs7208257 | 248 |
| 7 | rs6323 | 257 |
| 8 | rs2269272 | 263 |
| 9 | rs1042717 | 267 |
| 10 | rs1042714, rs1042713 | 275 |
| 11 | rs1611115 | 280 |
| 12 | rs5906754 | 284 |
| 13 | rs6330 | 294 |
| 14 | rs6313 | 297 |

| GRUPO PCR MULTIPLEX 5 | | |
|-----------------------|---|-----|
| Frag | Código rs | pb |
| 1 | rs6347 | 159 |
| 2 | rs6311 | 202 |
| 3 | rs17133878 | 207 |
| 4 | rs1044394, rs10443393 | 215 |
| 5 | rs1051312 | 221 |
| 6 | rs998424 | 239 |
| 7 | rs2229960, rs2229959 | 255 |
| 8 | rs2268115 | 262 |
| 9 | rs968714 | 266 |
| 10 | rs363020 | 273 |
| 11 | rs2032893 | 282 |
| 12 | rs498793 | 289 |
| 13 | rs40184 | 294 |
| 14 | rs1042719, rs1042720 | 297 |
| 15 | rs2227847, rs2227845, rs2227843, rs2227842 | 350 |

| GRUPO PCR MULTIPLEX 6 | | |
|-----------------------|-------------------------|-----|
| Frag | Código rs | pb |
| 1 | rs897453 | 150 |
| 2 | rs1044397, rs1044396 | 200 |
| 3 | rs1042718 | 212 |
| 4 | rs4680 | 226 |
| 5 | rs2652511 | 254 |
| 6 | rs2273505, rs2273506 | 259 |
| 7 | rs1800544 | 270 |
| 8 | rs11564774 | 282 |
| 9 | rs5569 | 291 |

El máximo número de fragmentos que se consiguió agrupar en una única reacción de PCR multiplex con la suficiente amplificación de todos ellos fue de 15 fragmentos (Grupo de PCR Multiplex 5). Se probaron distintas combinaciones, pero finalmente se distribuyeron los distintos fragmentos a amplificar en seis grupos de PCR multiplex como se muestra en la Tabla 34. En la Figura 39 se muestra el análisis de fragmentos de cada uno de estos 6 grupos.

Del mismo modo, se ha comprobado que la cantidad mínima de cebadores que se requiere para amplificar todos los fragmentos oscila entre 0,5 y 2 nanogramos siendo diferente para cada pareja.

Resultados

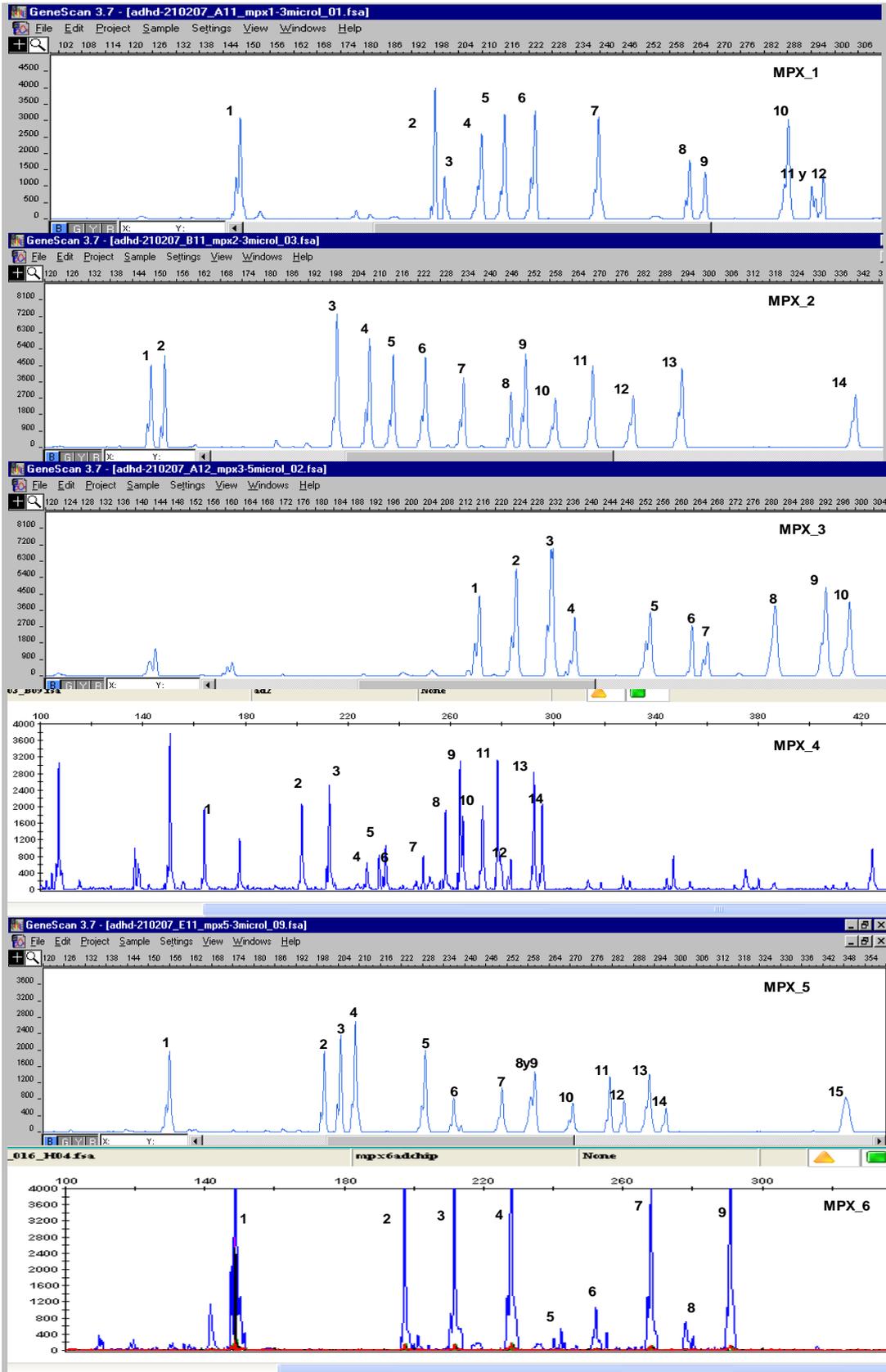


Figura 39.- Imágenes de los resultados de los análisis de fragmentos de los seis grupos de PCR Multiplex del chip de genotipado prototipo. Se han numerado en cada PCR cada uno de los fragmentos que componen esa reacción. En el eje “x” se indica el tamaño del fragmento en pares de bases y en el eje “y” la intensidad de amplificación de ese fragmento.

1.4. DISEÑO DE LAS SECUENCIAS DE OLIGONUCLEOTIDOS

Se han diseñado un total de 340 oligonucleótidos para la detección en el chip de los 84 polimorfismos seleccionados, ya que se requieren 4 oligonucleótidos por cada SNP como se ha explicado en el apartado de Sujetos, Materiales y Métodos. En la Figura 40 se muestran los cuatro oligonucleótidos que se diseñaron para la detección del SNP A/T con código rs6077690 perteneciente al gen SNAP-25 a modo de ejemplo del diseño de las sondas de detección. En el Anexo V se muestran las secuencias de los oligonucleótidos para los 84 SNPs tras la optimización que se describe más adelante.

Del mismo modo se diseñaron las secuencias de los oligonucleótidos control del proceso de hibridación. Se diseñaron dos secuencias, una correspondiente al control externo normal y al control externo mutante respectivamente, ambas secuencias se muestran en la Tabla 35.

Tras recibir y resuspender todos los oligonucleótidos como se ha indicado en el apartado de Sujetos, Materiales y Métodos, se colocaron de forma ordenada en siete placas de 384 pocillos para proceder a la producción del chip de genotipado.

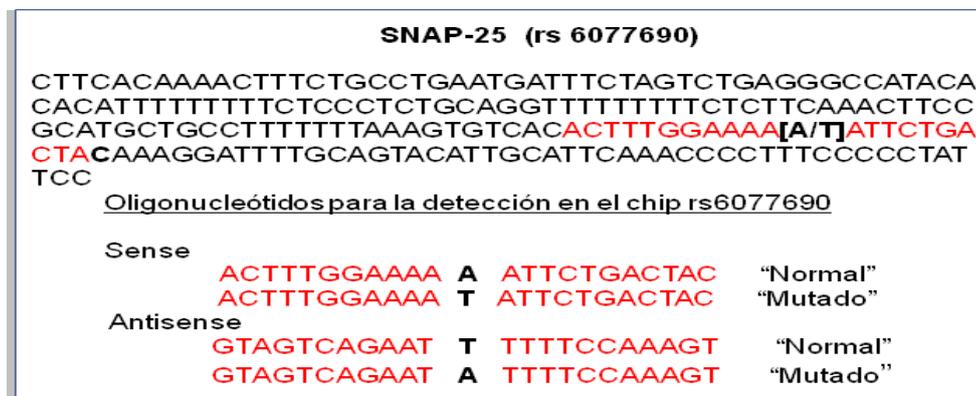


Figura 40.- Esquema que muestra los cuatro oligonucleótidos que fueron diseñados para la detección del SNP A/T con código rs6077690 perteneciente al gen SNAP-25. Se muestra la secuencia que contiene el SNP, la base que se sitúa en medio marcada en negrita y separada de las demás es el SNP que se quiere genotipar.

Tabla 35.- Tabla que recoge las secuencias de los dos oligonucleótidos control de la hibridación diseñados.

| Oligonucleótido | Secuencia |
|-------------------------|---------------------|
| Control Externo Normal | CTTGACGACTCCTGAACGG |
| Control Externo Mutante | CTTGACGACACCTGAACGG |

1.5. PRODUCCIÓN DEL CHIP DE GENOTIPADO

Las características de la impresión de los oligonucleótidos sobre la superficie del porta de vidrio de esta primera versión del chip de genotipado se muestran en la Tabla 36. Una vez producidos, los chips quedan listos para su posterior hibridación específica con las muestras amplificadas.

Tabla 36.- Tabla que resume las principales características técnicas del chip de genotipado en su fase de prototipo. Se muestran el número de polimorfismos y puntos control, así como el tamaño del área “espoteada” y la longitud de los oligonucleótidos de detección.

| | |
|--------------------------------------|---|
| Número de Arrays: | 1 |
| Tamaño del Array / área “espoteada”: | 25 x 75 mm / 14,48x34,48 mm |
| Longitud de las sondas: | Entre 17 y 27 bases |
| Hebras que analiza: | Ambas |
| Número de polimorfismos: | 87 |
| Control externo: | 1 (oligonucleótido artificial) 254 puntos |
| Control de fondo: | DMSO 1104 puntos |
| Puntos replicados: | 87 x 40 = 3248 |
| Número total de puntos | 4408 |

1.6. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LA HIBRIDACIÓN

1.6.1. AMPLIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS (PCR multiplex)

Se comprobó mediante migración en gel de agarosa 2% que los seis grupos de PCR multiplex con ADNs de la colección de la población general funcionaran. No se comprueba que estén todos los fragmentos, sino simplemente si se ha producido reacción de amplificación o no antes de seguir con el proceso de preparación de la muestra para su posterior hibridación. Un ejemplo de esta comprobación se muestra en la Figura 41. Posteriormente, se juntaron todos los grupos de PCR correspondientes a una misma muestra y se procedió a realizar la fragmentación y el marcaje de la misma.

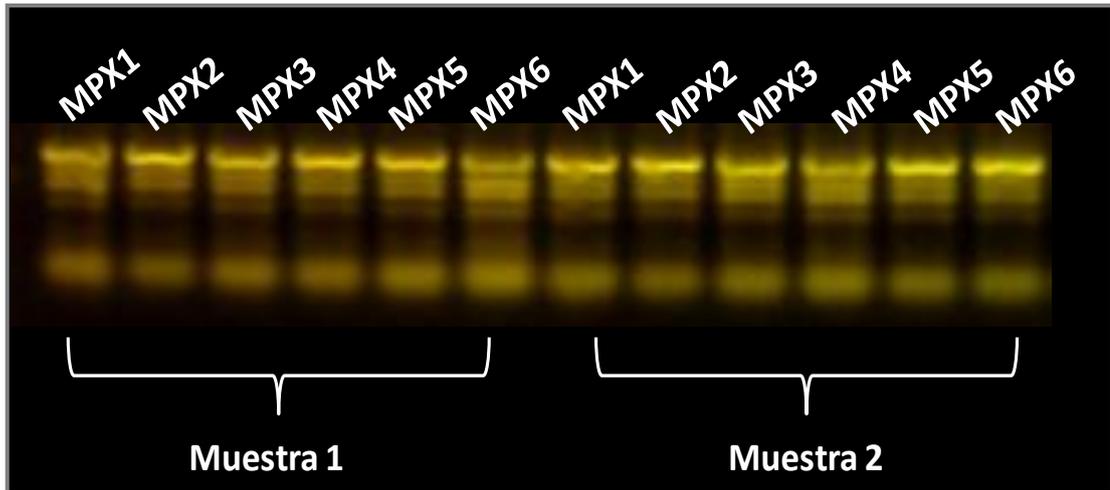


Figura 41.- Fotografía de un gel de agarosa 2% en el que se comprueba la amplificación de cada uno de los seis grupos de PCR multiplex para dos muestras de pacientes de TDAH (la no amplificación se vería como ausencia de bandas en el gel).

1.6.2. FRAGMENTACIÓN DE LA MUESTRA

En la Tabla 37 se muestran las condiciones de fragmentación que se establecieron como óptimas para las muestras para su posterior hibridación en el chip de genotipado.

Tabla 37.- Tabla resumen de la mezcla de reactivos y protocolo de fragmentación de la muestra que se ha establecido como óptima para la preparación de las muestras para su posterior hibridación en el chip de genotipado. Se añaden 36 μ l de la mezcla de fragmentación (6 μ l por grupo de PCR). El volumen final será de 186 μ l sin tener en cuenta posibles evaporaciones y pérdidas de volumen por pipeteo.

| Reactivos Fragmentación | Volumen (μ l) |
|-----------------------------------|-------------------------|
| H2O Milli-Q | 27,3 |
| Fosfatasa alcalina (1 U/ μ l) | 6,6 |
| EDTA | 0,6 |
| DNAsa I (1 U/ μ l) | 1,5 |
| Volumen final | 36 |
| | Protocolo fragmentación |
| | 37°C 30 minutos. |
| | 95°C 10 minutos. |
| | 4°C Indefinidamente. |

1.6.3. MARCAJE DE LA MUESTRA

Se probaron diferentes condiciones de marcaje y finalmente se establecieron las condiciones que se muestran en la Tabla 38 como óptimas. Se estableció que el método de marcaje óptimo consistía en adicionar un nucleótido biotinilado a los productos de amplificación, posteriormente revelarlo, añadiendo estreptavidina unida al fluoróforo Cy3 durante el proceso de hibridación. Tras este paso y la adición del control externo de hibridación (10 µl) y desnaturalización, las muestras quedan listas para su posterior hibridación en el chip de genotipado.

Tabla 38.- Tabla resumen de la mezcla de reactivos y protocolo de marcaje de la muestra que se ha establecido como óptima para las muestras para su posterior hibridación en el chip de genotipado. Se añade a cada pocillo 84 µl de la mezcla de marcaje (14 µl por grupo de PCR). El volumen final será de 270 µl.

| Reactivos Marcaje | Volumen (µl) |
|---------------------------|-----------------|
| 5X TdT buffer | 21 |
| CoCl ₂ (25 mM) | 21 |
| TdT (400 U/µl) | 3 |
| Biotin-11-ddUTP | 1,8 |
| H ₂ O Milli-Q | 37,2 |
| Volumen Total | 84 |
| Protocolo marcaje | |
| 37°C | 60 minutos. |
| 4°C | Indefinidamente |

1.7. HIBRIDACIÓN DE LA MUESTRA EN EL CHIP DE GENOTIPADO

Se estableció que las condiciones idóneas para la hibridación de las muestras en el chip de genotipado son de una hora a una temperatura de 42°C en la plataforma de hibridación automática Ventana[®].

1.8. ESCANEADO Y CUANTIFICACIÓN DE LA HIBRIDACIÓN

Se establecieron como parámetros óptimos de escaneado para el chip de genotipado una PMT (potencia del tubo fotomultiplicador) del láser de excitación del 38% para la correcta detección de la hibridación sin saturación de los puntos. Esta PMT variará en función del escáner utilizado y deberá ser ajustada en cada caso, ya que la potencia del láser varía entre los distintos aparatos. Al mismo tiempo se estableció que la longitud de onda óptima para la detección del fluoróforo Cy3 es a 543 nm. En las Figura 42 y Figura 43 se muestra la imagen de escaneado de una muestra de ADN de la población general y se esquematiza el proceso de encajar la gradilla y

la cuantificación. Se creó una gradilla específica para el chip de genotipado que indica a qué oligonucleótido exactamente corresponde cada punto del chip.

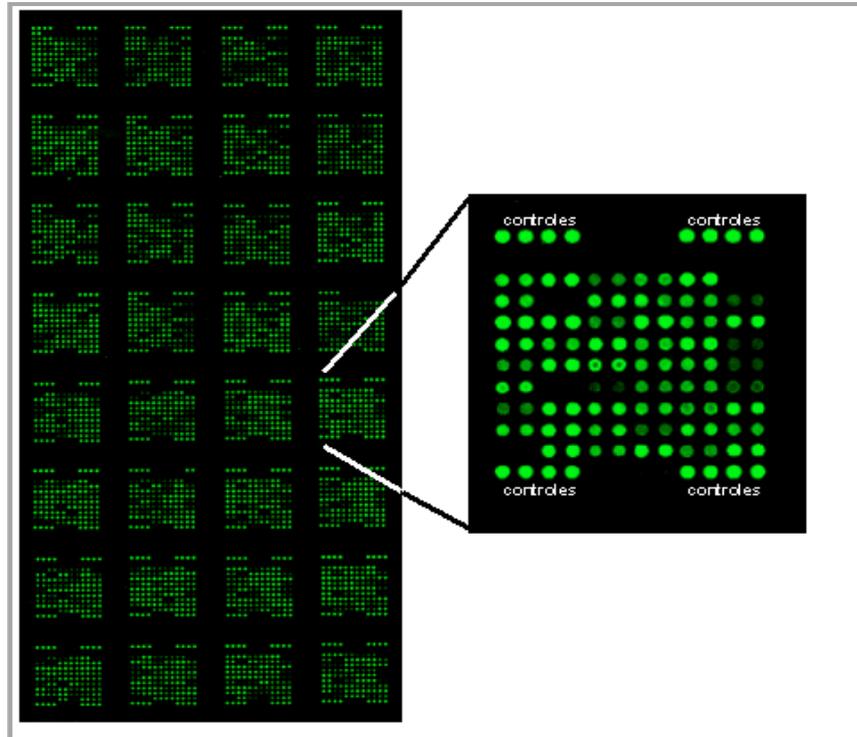


Figura 42.- Imagen de la hibridación de una muestra de ADN de la colección de ADNs de la población general en la versión prototipo del chip de genotipado. Se pueden observar los 32 subarrays que lo componen. Se muestra uno de ellos ampliado donde en las cuatro esquinas se indican los controles externos de la hibridación y donde se pueden observar el resto de puntos correspondientes a los oligonucleótidos de detección de las mutaciones más detalladamente.

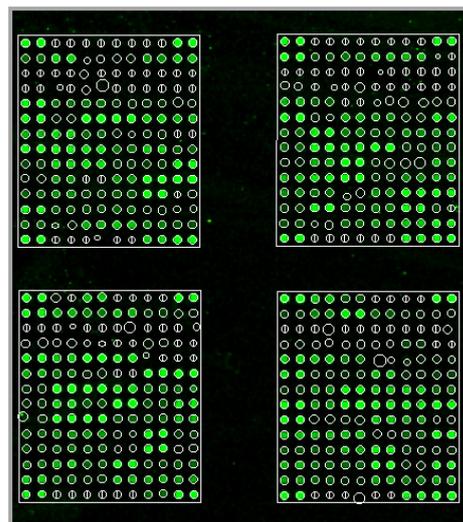


Figura 43.- Imagen ampliada de la anterior, en la que se muestra una zona del array (cuatro subarrays) en la que se muestra la gradilla creada para el chip de genotipado que permite identificar cada punto con el oligo que representa. Una vez “encajada”, es decir, que cada punto coincida exactamente en la gradilla y en el chip, se procedió a la cuantificación de la hibridación de cada oligonucleótido y del fondo (señal inespecífica), de los controles negativos además de los controles externos de hibridación, mediante el programa Mapix.

1.9. OPTIMIZACIÓN DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS DE DETECCIÓN

En los primeros pasos de la selección de oligonucleótidos del chip de genotipado se optimizaron únicamente 15 polimorfismos. Es decir, tanto la señal de hibridación como el poder discriminatorio de los oligonucleótidos fue bueno para 15 de los 84 SNPs que se evaluaron. En la Figura 44 se muestran cuatro de los polimorfismos optimizados a modo de ejemplo, y en el Anexo V se muestran los resultados de la discriminación de todos los SNPs tras la optimización de los oligonucleótidos. Para los otros polimorfismos se diseñaron nuevos oligonucleótidos, acortándolos, alargándolos o moviendo el SNP a la derecha o izquierda de la posición central, para mejorar bien la mala hibridación o bien la discriminación, hasta conseguir la óptima detección de los polimorfismos. Un ejemplo de esta optimización se muestra en la Figura 45 para dos SNPs (el SNP con códigos rs363006 y rs6077690 pertenecientes al gen SNAP25) donde se muestran las representaciones gráficas de antes y después de la optimización de oligonucleótidos. En el Anexo V se muestran también todas las secuencias de los oligonucleótidos optimizados para la detección de cada uno de los 84 SNPs.

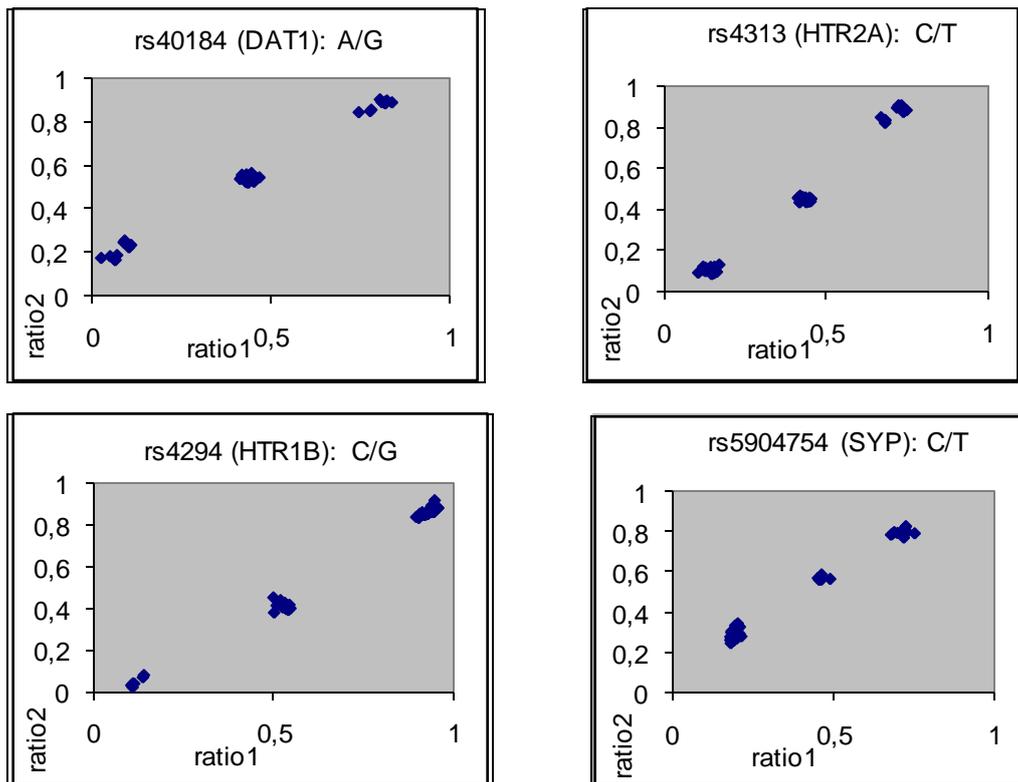


Figura 44.- Gráficas obtenidas de la representación de las relaciones de las intensidades de hibridación de los oligonucleótidos normales y mutados correspondientes a los SNPs con códigos rs40184 (DAT1), rs4313 (HTR2A), rs4294 (HTR1B) y rs5904754 (SYP). Se observa la correcta discriminación de los tres genotipos (AA, AB y BB) en todos ellos.

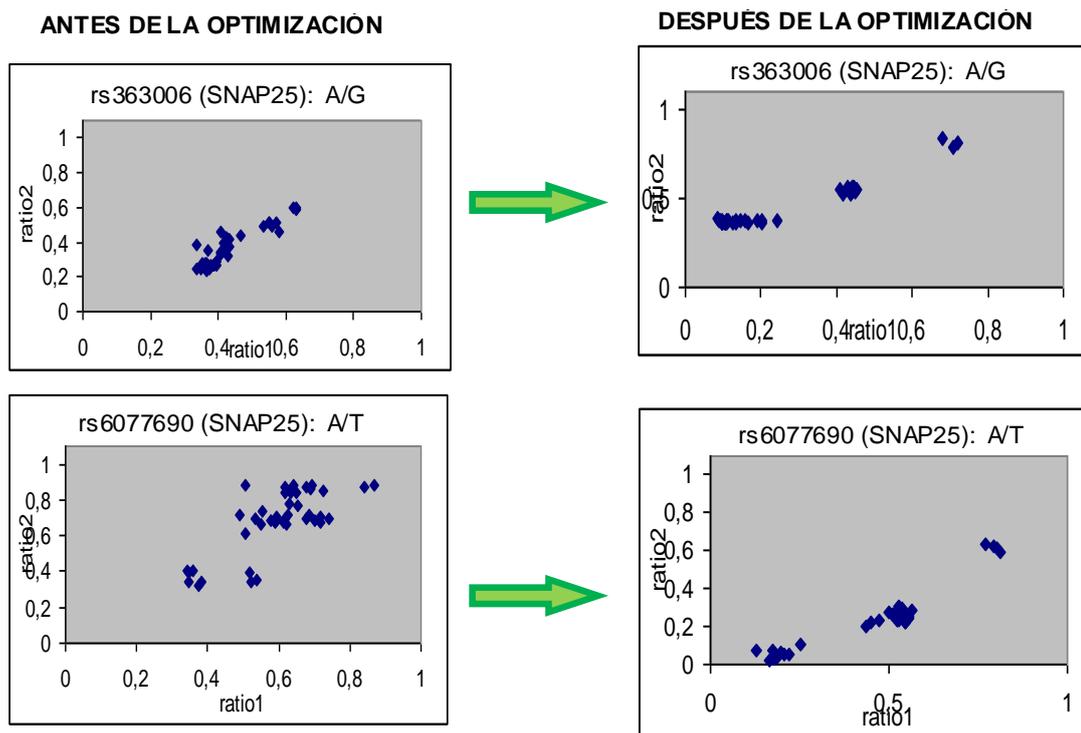


Figura 45.- Ejemplo de optimización de oligonucleótidos para los SNPs con código rs363006 y rs6077690 pertenecientes al gen SNAP25. Se muestran las gráficas obtenidas de la representación de las relaciones de las intensidades de hibridación de los oligonucleótidos normales y mutados antes (figuras de la izquierda) y después de la optimización (figuras de la derecha).

1.10. VALIDACIÓN TÉCNICA DEL CHIP DE GENOTIPADO

Se realizó una validación técnica del chip de genotipado que consistió en llevar a cabo un estudio para evaluar diversas variables del funcionamiento de la herramienta de genotipado tales como su exactitud y reproducibilidad inter e intradía. El término exactitud se refiere a cómo de cerca del valor real se encuentra el valor medido, por lo tanto al evaluar la exactitud del chip de ADN se está valorando la capacidad de esta herramienta de identificar correctamente los alelos (AA/AB/BB) para todos los polimorfismos presentes. La reproducibilidad es uno de los principios esenciales del método científico, y se refiere a la capacidad que tenga una prueba o experimento de ser reproducido o replicado. Para ello se hibridaron 10 muestras control (o 10 réplicas de una misma muestra si es un genotipo muy poco frecuente) de cada genotipo por SNP y se comprobó que todos los SNPs hibridaban y discriminaban de forma adecuada y que la reproducibilidad tanto inter como intradía eran del 100%. Estos resultados se muestran en el Anexo V.

FASE 2: ANÁLISIS PRELIMINAR DE ASOCIACIÓN CON MUESTRAS DE PACIENTES DE TDAH

Se hibridaron 274 muestras de pacientes diagnosticados de TDAH en el chip de genotipado y se realizó un análisis preliminar de asociaciones individuales para testar las bases genéticas del TDAH en la población de estudio y por tanto la viabilidad del proyecto completo. De los 84 SNPs que el chip fue capaz de detectar, se excluyeron del análisis seis ya que eran monomórficos, es decir, al analizar las muestras sólo se ha encontrado 1 genotipo de los 3 posibles. Los SNPs monomórficos no aportan información al análisis estadístico y por tanto se excluyen del mismo. Este resultado se ajusta a lo esperado según las frecuencias descritas para estos polimorfismos en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Se siguieron los pasos y se interrogaron las variables que se describen en el apartado de Sujetos, Materiales y Métodos Fase 2 del estudio piloto. No se muestran detalladamente los resultados de cada análisis realizado ya que se trata únicamente de un análisis preliminar y los resultados de asociación obtenidos no debieran ser interpretados como definitivos. Se encontraron 21 SNPs en desequilibrio de ligamiento entre sí y las conclusiones de posibles asociaciones del análisis piloto fueron las siguientes;

- Parecía existir relación entre las siguientes variables:

— Con el subtipo de TDAH (n=245) las variables clínicas que parecían estar asociadas fueron tanto la presencia/ausencia de antecedentes (p=0,023) como el sexo (p=0,048). El subtipo hiperactivo junto con el combinado mostró una asociación con la ausencia de antecedentes personales asociados a TDAH y con el sexo masculino. Del mismo modo, dos SNPs mostraron asociación estadísticamente significativa (p<0,05) en el test de alelos con el subtipo de TDAH pertenecientes a los genes que codifican para la subunidad $\alpha 2A$ del adrenoceptor (ADRA2A) y el factor de crecimiento nervioso β (NGFB), éste último mostró también asociación estadísticamente significativa en el test de genotipos. Estos SNPs se muestran en la Tabla 39 ordenados por su valor de significación estadística. Se muestra también el valor p de asociación obtenido en los dos tests y los alelos de riesgo para el subtipo hiperactivo o combinado.

— En la variable evolución de la enfermedad existían muchos valores perdidos sobre la puntuación del test basal en el momento en el que se realizó el análisis estadístico, por lo que la población analizada fue muy pequeña (n=122) y los resultados deben ser interpretados con cautela. Al analizar esta variable, parecía acercarse a la significación estadística la asociación de buena evolución con la ausencia de antecedentes personales asociados a TDAH (p=0,056). En el test de alelos se encontró asociación con mala evolución dos SNPs pertenecientes a los genes que codifican para la proteína de 25 kDa

asociada al sinaptosoma y para la beta arrestina 2 (SNAP25 y ARRB2) y un tercero que mostró un valor cercano a la significación estadística, el que codifica para la catecol-O-metiltransferasa (COMT). Todos ellos se muestran en la Tabla 40, y como puede observarse, ninguno de ellos mostró la suficiente asociación en el test de genotipos.

Tabla 39.- Tabla que muestra los SNPs que mostraron significación estadística en el test de alelos en relación a la variable clínica subtipo de TDAH. El SNP con código rs6330 perteneciente al gen NGFB mostró además asociación estadísticamente significativa en el test de genotipos y se ha resaltado en color verde. En la tabla se muestra el código rs, el nombre del gen al que pertenecen, el cromosoma y la localización cromosómica, así como el alelo de riesgo para el subtipo hiperactivo o combinado encontrado y el valor p obtenido tanto en el test de alelos como en el de genotipos para ambos SNPs.

| Código rs | Gen | Crom. | Localización | Alelo riesgo | P Test alelos | P Test genotipos |
|-----------|--------|-------|--------------|--------------|---------------|------------------|
| rs6330 | NGFB | 1 | 115630836 | A | 0,003208642 | 0,004500137 |
| rs1800544 | ADRA2A | 10 | 112826493 | C | 0,044927676 | 0,121718163 |

Tabla 40.- Tabla que muestra los SNPs que mostraron significación estadística en el test de alelos en relación a la variable clínica evolución del TDAH calculada según la puntuación obtenida en el test DuPaul en el momento del diagnóstico y en el momento de reclutamiento de la muestra. En la tabla se muestra el código rs, el nombre del gen al que pertenecen, el cromosoma y la localización cromosómica, así como el alelo de riesgo para el subtipo hiperactivo o combinado encontrado y el valor p obtenido tanto en el test de alelos como en el de genotipos para los tres SNPs. Se encuentran ordenados por el valor de significación obtenido en el test de alelos y ninguno de ellos mostró asociación estadísticamente significativa al realizar el test de genotipos.

| Código rs | Gen | Crom. | Localización | Alelo riesgo | P Test alelos | P Test genotipos |
|-----------|--------|-------|--------------|--------------|---------------|------------------|
| rs3787283 | SNAP25 | 20 | 10232418 | G | 0,024465416 | 0,086497828 |
| rs1045280 | ARRB2 | 17 | 4569387 | C | 0,049727396 | 0,172183892 |
| rs4680 | COMT | 22 | 18331271 | A | 0,055970831 | 0,115275928 |

— En la severidad de los síntomas (n=268) evaluada según la escala ICG en el momento de reclutamiento de la muestra, tras al menos dos años de seguimiento, parecían estar asociada la presencia de comorbilidades ($p < 0,005$) con una mayor severidad de la sintomatología. Así como cuatro SNPs que mostraron asociación estadísticamente significativa tanto en el test de alelos como en el de genotipos. Los resultados de esta comparación se muestran en la Tabla 41; en ella puede observarse que tres de los cuatro SNPs significativos pertenecen al gen que codifica para la sinaptotagmina (SYP), lo que parecía indicar que este gen sería un interesante candidato de asociación con la severidad de la sintomatología en la población de estudio, el otro SNP asociado pertenece al gen que codifica para la Subunidad 2B del receptor ionotrópico de glutamato.

Tabla 41.- Tabla que muestra los SNPs que mostraron significación estadística tanto en el test de alelos como en el de genotipos en relación a la variable clínica severidad de la sintomatología de TDAH evaluada según la puntuación obtenida en la escala ICG en el momento de reclutamiento de la muestra tras al menos dos años de seguimiento clínico. En la tabla se muestra el código rs, el nombre del gen al que pertenecen, el cromosoma y la localización cromosómica, así como el alelo de riesgo para el subtipo hiperactivo o combinado encontrado y el valor p obtenido tanto en el test de alelos como en el de genotipos para los cuatro SNPs. Se encuentran ordenados por el valor de significación obtenido en el test de alelos y todos ellos mostraron además asociación estadísticamente significativa al realizar el test de genotipos, por ello se encuentran señalados en verde.

| Código rs | Gen | Crom. | Localización | Alelo riesgo | P Test alelos | P Test genotipos |
|-----------|--------|-------|--------------|--------------|---------------|------------------|
| rs5906754 | SYP | X | 48947171 | C | 0,000192931 | 0,002741146 |
| rs2293945 | SYP | X | 48934562 | T | 0,002422768 | 0,007325827 |
| rs3817678 | SYP | X | 48934269 | G | 0,002422768 | 0,007325827 |
| rs2268115 | GRIN2B | 12 | 13760992 | A | 0,012322688 | 0,018681176 |

- En la normalización clínica de los síntomas (n=270), parecía existir una asociación entre la presencia de comorbilidades ($p=0,0005$) y la no normalización clínica de los síntomas. También parecía existir asociación con dos de los SNPs detectados por el chip de genotipado, ambos pertenecientes al gen que codifica para la triptófano hidroxilasa TPH2. Esta variable se evaluó según la puntuación obtenida en el test DuPaul teniendo en cuenta el sexo y la edad de los pacientes como recomienda la bibliografía y como se explicará con más detalle en el análisis completo de asociación. Los resultados de esta comparación se muestran en la Tabla 42.

Tabla 42.- Tabla que muestra los SNPs que mostraron significación estadística en el test de alelos en relación a la variable normalización clínica de los síntomas de TDAH tras al menos dos años de seguimiento clínico. En la tabla se muestra el nombre del gen al que pertenecen, el código rs y el valor de p obtenido tanto en el test de alelos como en el de genotipos para los 2 SNPs, ambos pertenecientes al gen TPH2. Se encuentran ordenados por el valor de significación obtenido en el test de alelos y uno de ellos mostró además asociación estadísticamente significativa al realizar el test de genotipos (resaltado en color verde).

| Código rs | Gen | Crom. | Localización | Alelo riesgo | P Test alelos | P Test genotipos |
|-----------|------|-------|--------------|--------------|---------------|------------------|
| rs1386493 | TPH2 | 12 | 70641446 | G | 0,036182878 | 0,074384452 |
| rs1843809 | TPH2 | 12 | 72348698 | T | 0,050210637 | 0,047528871 |

- No se encontraron asociaciones significativas entre las demás variables.

En vista de las asociaciones obtenidas en el estudio piloto que apoyaban la base genética de los fenotipos analizados, resultó de gran interés realizar el estudio completo de asociación y seguir profundizando en las bases genéticas del trastorno, aumentando el número de muestras, los polimorfismos y las variables a analizar. Para ello se genotipó la totalidad de las muestras recogidas además de los ADN controles, al mismo tiempo que se hizo una nueva revisión bibliográfica para la inclusión de los polimorfismos descritos más recientemente en estudios del tipo GWAS, además de incluir el genotipado de reordenamientos genómicos y de incluir como variable a predecir la respuesta a fármacos (tanto a metilfenidato como a atomoxetina).

2. ESTUDIO COMPLETO DE ASOCIACIÓN

2.1. AMPLIFICACIÓN DEL ADN GENÓMICO

Se tomaron alícuotas del ADN ya extraído de las 799 muestras correspondientes a 400 controles sanos y 399 pacientes de TDAH para llevar a cabo el protocolo de amplificación genómica que se ha descrito en el apartado de Sujetos, Materiales y Métodos. Como resultado se obtuvo ADN en cantidad y calidad suficiente para llevar a cabo el genotipado de las 799 muestras por todas las técnicas mencionadas.

2.2. ENSAYO DE GENOTIPADO GOLDENGATE®

Se realizó el análisis de viabilidad para los 216 SNPs seleccionados, tal y como se ha descrito en Sujetos, Materiales y Métodos, con el resultado de que 8 SNPs no pudieron ser genotipados por esta plataforma y tampoco podían ser sustituidos por otro SNP del mismo boque haplotípico. Estos 8 SNPs se genotiparon por PCR competitiva, y se describen en el apartado 2.3. El resto de SNPs (208) fueron genotipados para las 799 muestras, obteniéndose los resultados de genotipos que fueron analizados y filtrados previamente a realizar el análisis estadístico de asociación.

2.3. GENOTIPADO MEDIANTE PCR COMPETITIVA (ENSAYO KASPar®)

Mediante esta técnica fueron genotipados los SNPs que no podían serlo con la plataforma GoldenGate®, que se corresponden a los 8 SNPs que se muestran en la Tabla 43. La síntesis y validación de las sondas específicas funcionó correctamente para todos los SNPs, excepto para uno de ellos, el SNP con código rs2975226 perteneciente al gen SLC6A3, para el que fue necesario diseñar nuevas sondas. Tras la nueva síntesis y validación, se genotipó correctamente.

El genotipado de los 8 SNPs genotipados en las 799 muestras mostró una tasa de éxito o *call rate* superior al 80% en todos los casos.

Tabla 43.- Tabla que muestra los 8 SNPs que fueron genotipados mediante PCR competitiva (Ensayo KASPar®). Se muestra el código rs de cada uno de ellos, el gen al que pertenecen, el cromosoma y la localización cromosómica.

| Código rs | Gen | Cromosoma | Localización |
|------------|--------|-----------|--------------|
| rs2227847 | DRD5 | 4 | 9393491 |
| rs27072 | SLC6A3 | 5 | 1447522 |
| rs11564774 | SLC6A3 | 5 | 1447600 |
| rs11133767 | SLC6A3 | 5 | 1454580 |
| rs2975226 | SLC6A3 | 5 | 1498616 |
| rs1800955 | DRD4 | 11 | 626784 |
| rs71647871 | CES1 | 16 | 54415071 |
| rs6565113 | CDH13 | 16 | 81665147 |

2.4. GENOTIPADO DEL CYP2D6: PHARMAchip®

Mediante el chip de genotipado PHARMAchip®, solamente fueron genotipadas 58 de las 399 muestras de pacientes de TDAH, ya que eran los únicos casos en los que se les había administrado atomoxetina como tratamiento y se disponía de información sobre su respuesta a este fármaco.

2.4.1. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE GENOTIPADO

Siguiendo la guía de uso de PHARMAchip v3.0 suministrada por Progenika Biopharma S.A. se migraron todos los grupos 6 y 7 de PCR de cada muestra en geles de agarosa para comprobar la amplificación, ya que son estos grupos en los que se amplifica la delección o duplicación del gen completo y por tanto los más sensibles. En la Figura 46 se muestra la imagen de un gel para las primeras 12 muestras. Posteriormente se hibridaron las muestras en los chips y se analizaron los resultados. Hubo 11 muestras que se tuvieron que repetir antes de obtener correctamente el genotipado principalmente porque estos dos grupos de PCR no funcionaron adecuadamente. En la Tabla 44 se muestran los resultados de genotipo y fenotipo calculado con el software para las 58 muestras seleccionadas. Como puede observarse en la Figura 47, la distribución de genotipos del CYP2D6 se ajusta a lo descrito en la bibliografía para población caucásica: metabolizadores ultrarrápidos 4,5%, normales+intermedios 80-94% y lentos 5-10% (Cortés et al. 2007).

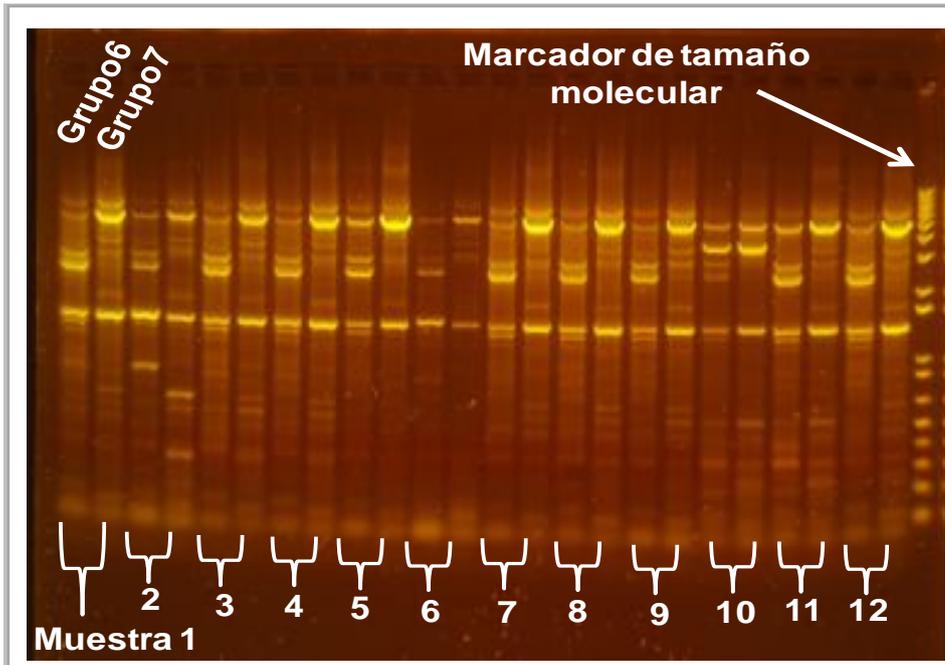


Figura 46.- Fotografía de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio en el que se migraron los grupos de PCR 6 y 7 correspondientes a la duplicación y delección del gen CYP2D6 para las 12 primeras muestras de pacientes de TDAH previamente tratados con atomoxetina.

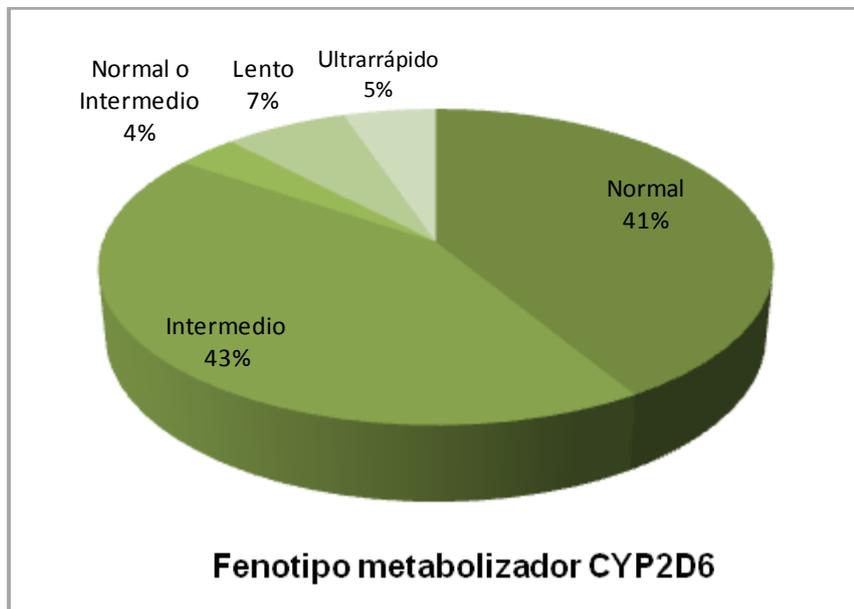


Figura 47.- Diagrama de sectores que muestra los porcentajes de los diferentes tipos de metabolizadores en relación con el CYP2D6. Se muestran los resultados para todas las posibilidades de fenotipo metabolizador: lento 7%, intermedio 43%, normal o intermedio 4%, normal 41% y ultrarrápido 5%. La distribución de genotipos se ajusta a la citada para población caucásica (Cortés et al. 2007).

Tabla 44.- Tabla resumen de los resultados de PHARMAchip® para las 58 muestras analizadas. En la tabla se muestran el código de cada muestra, el genotipo obtenido combinando los resultados de los SNPs y las duplicaciones y deleciones del CYP2D6, y el fenotipo de metabolizador asociado a cada genotipo.

| Código muestra | GENOTIPO CYP2D6 | METABOLIZADOR | Código muestra | GENOTIPO CYP2D6 | METABOLIZADOR |
|----------------|----------------------|---------------------|----------------|----------------------|---------------------|
| AD_073 | *1/*1 | Normal | AD_322 | *1/*41 | Intermedio |
| AD_078 | *1XN/*2 | Ultrarrápido | AD_332 | *1/*41 | Intermedio |
| AD_089 | *1/*1 | Normal | AD_351 | *1/*3 | Intermedio |
| AD_092 | *4/*41 | Intermedio | AD_362 | *1/*1 | Normal |
| AD_102 | *4/*10 | Intermedio | AD_336 | *1/*3 | Intermedio |
| AD_131 | *2/*10 | Intermedio | AD_236 | *1/*1 | Normal |
| AD_151 | *1/*17 | Intermedio | AD_023 | *4/*31 | Lento |
| AD_176 | *2/*2 | Normal | AD_061 | *2XN/*2 | Ultrarrápido |
| AD_180 | *1/*35 | Normal | AD_142 | *1/*1 | Normal |
| AD_188 | *1/*4 | Intermedio | AD_157 | *1/*1 | Normal |
| AD_194 | *1/*9 | Intermedio | AD_165 | *4/*35 | Intermedio |
| AD_199 | *1XN/*2 | Ultrarrápido | AD_184 | *1/*5 | Intermedio |
| AD_211 | *1/*10 | Intermedio | AD_268 | *1/*2 | Normal |
| AD_216 | *1/*1 | Normal | AD_279 | *2XN/*5 | Normal |
| AD_219 | *1/*35 | Normal | AD_287 | *1/*1 | Normal |
| AD_230 | *4/*5 | Lento | AD_134 | *1/*4 | Intermedio |
| AD_231 | *2/*5 | Intermedio | AD_034 | *1XN/*4 o *1/*4XN | Normal o Intermedio |
| AD_233 | *2/*41 | Intermedio | AD_164 | *1/*4 | Intermedio |
| AD_237 | *1/*1 | Normal | AD_028 | *1/*4 | Intermedio |
| AD_244 | *1/*6 | Intermedio | AD_029 | *1/*1 | Normal |
| AD_253 | *9/*35 | Intermedio | AD_041 | *1/*2 | Normal |
| AD_159 | *4/*4 | Lento | AD_178 | *2/*35 | Normal |
| AD_160 | *1/*1 | Normal | AD_179 | *1/*9 | Intermedio |
| AD_163 | *4/*4 | Lento | AD_186 | *1/*4 | Intermedio |
| AD_259 | *1/*2 | Normal | AD_187 | *2/*41 | Intermedio |
| AD_262 | *1/*1 | Normal | AD_238 | *1/*2 | Normal |
| AD_263 | *1/*1 | Normal | AD_260 | *1/*1 | Normal |
| AD_295 | *2XN/*4 o *2/*4XN | Normal o Intermedio | AD_276 | *1/*41 | Intermedio |
| AD_309 | *1/*1 | Normal | AD_283 | *2/*41 | Intermedio |

2.5. KIT DE DETECCIÓN DE REORDENAMIENTOS GENÓMICOS Y VNTRs

2.5.1. DISEÑO DE CEBADORES ESPECÍFICOS

Se diseñaron numerosas parejas de cebadores y se probaron numerosas condiciones de amplificación diferentes para conseguir una óptima amplificación de los fragmentos de interés en cada una de las 4 PCRs, especialmente para la VNTR de DRD4, cuya amplificación fue la más complicada y para la que finalmente se utilizaron las mismas secuencias de cebadores descritas por Kotler et al. (2000). De todas las parejas diseñadas, se seleccionaron las cuatro que mejores resultados ofrecieron. Estas secuencias se muestran en el Anexo IV.

2.5.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS PCRs

Tras numerosas pruebas se establecieron las condiciones óptimas de amplificación para cada una de las cuatro PCRs, que son las que se describen a continuación en las Tablas 45 y 46.

Tabla 45.- Tabla que muestra las mezclas de reactivos que se establecieron como óptimas para cada una de las 4 reacciones de PCR del kit de detección de reordenamientos genómicos y VNTRs y con las que se han amplificado todas las muestras.

| DRD4 inserción 120bp | volumen (μl) |
|-----------------------------------|--------------|
| Quiagen Master mix | 12,5 |
| Mezcla cebadores (NED) a 20 ng/μl | 2 |
| Mezcla colas marcadas a 50 ng/μl | 2 |
| Agua MiliQ | 3,5 |
| ADN a 20 ng/μl | 5 |
| vol total | 25 μl |

| DAT1 VNTR | volumen (μl) |
|-----------------------------------|--------------|
| Quiagen Master mix | 12,5 |
| Mezcla cebadores (PET) a 30 ng/μl | 2 |
| Mezcla colas marcadas a 50 ng/μl | 2 |
| Agua MiliQ | 3,5 |
| ADN a 20 ng/μl | 5 |
| vol total | 25 μl |

| SLC6A4 inserción 44pb | volumen (μl) |
|-----------------------------------|--------------|
| Quiagen Master mix | 12,5 |
| Mezcla cebadores (FAM) a 20 ng/μl | 2 |
| Mezcla colas marcadas a 50 ng/μl | 2 |
| Agua MiliQ | 3,5 |
| ADN a 20 ng/μl | 5 |
| vol total | 25 μl |

| DRD4 VNTR | volumen (μl) |
|------------------------------------|--------------|
| Mezcla de cebadores (VIC) 6 μM | 2,5 |
| Biotools 10x Buffer PCR | 2,5 |
| Biotools MgCl ₂ (50 mM) | 1 |
| Biotools Taq 1000 (5 U/μl) | 1 |
| AB dNTPs (10 mM) | 2 |
| DMSO 50% | 4 |
| Agua MiliQ | 7 |
| ADN a 20 ng/μl | 5 |
| vol total | 25 μl |

Tabla 46.- Tabla descriptiva de los protocolos de PCR para los cuatro reordenamientos incluidos en el kit de detección de reordenamientos genómicos y VNTRs. Se muestran los diferentes pasos de la reacción y las condiciones de tiempo y temperatura de cada uno de ellos.

| DRD4 inserción 120 pb, SLC6A4 inserción 44pb y DAT1 VNTR | | |
|--|-------------------|------------------------|
| Activación de la DNA polimerasa | 94°C | 2 min |
| 10 ciclos | Desnaturalización | 94°C 10 s |
| | Hibridación | 60°C 30 s |
| | Extensión | 68°C 5 min |
| 25 ciclos | Desnaturalización | 94°C 15 s |
| | Hibridación | 60°C 30 s |
| | Extensión | 68°C 5 min + 5 s/ciclo |
| Extensión final | 68°C | 7 min |
| Paso final | 4°C | ∞ |

| DRD4 VNTR | | |
|--|-------------------|-----------------|
| Activación de la DNA polimerasa | 95°C | 5 min |
| 30 ciclos | Desnaturalización | 95°C 45 s |
| | Hibridación | 55°C 45 s |
| | Extensión | 72°C 1 min 30 s |
| Extensión final | 72°C | 5 min |
| Paso final | 4°C | ∞ |

2.5.3. CONFIRMACIÓN POR SECUENCIACIÓN

Se confirmó por secuenciación que los fragmentos que se estaban amplificando con cada pareja de cebadores eran los esperados y al mismo tiempo se comprobó en el caso de las VNTRs que el número de repeticiones coincidía para los tamaños de fragmentos esperados. En la Tabla 47 se muestran los tamaños de los fragmentos esperados para cada una de las variantes descritas para cada polimorfismo. En la Figura 48 se muestra el resultado de secuenciar completamente el fragmento amplificado para la VNTR de DAT1 para una muestra de un paciente de TDAH, donde se comprueba que el número de repeticiones (R) para ese tamaño de fragmento es de 10R.

de esta forma para todas las muestras. En las Figuras 49 y 50 se muestran los resultados de electroforesis convencional para algunas de las muestras analizadas para las inserciones de SLC6A4 y DRD4.

Por otro lado, para las VNTRs de DRD4 y DAT1 se continuó utilizando la electroforesis capilar, ya que se requiere una mayor resolución, pero de forma individual para cada una de las PCRs para evitar el problema de saturación del capilar descrito anteriormente. En la Figura 51 se muestran los resultados de electroforesis capilar para dos muestras en las que se ha amplificado específicamente la VNTR de DRD4 y dos en las que se ha amplificado la VNTR de DAT1.

Se genotiparon las 399 muestras de pacientes de TDAH para los cuatro reordenamientos. En el caso de las inserciones de tamaño fijo de SLC6A4 y DRD4 se genotiparon además las 400 muestras control ya que estas inserciones se han asociado con un mayor riesgo de TDAH. Se elaboró una base de datos con los resultados de los genotipos para cada una de las muestras analizadas. En la Tabla 48 se muestra el resumen de los genotipos obtenidos en el análisis de las muestras.

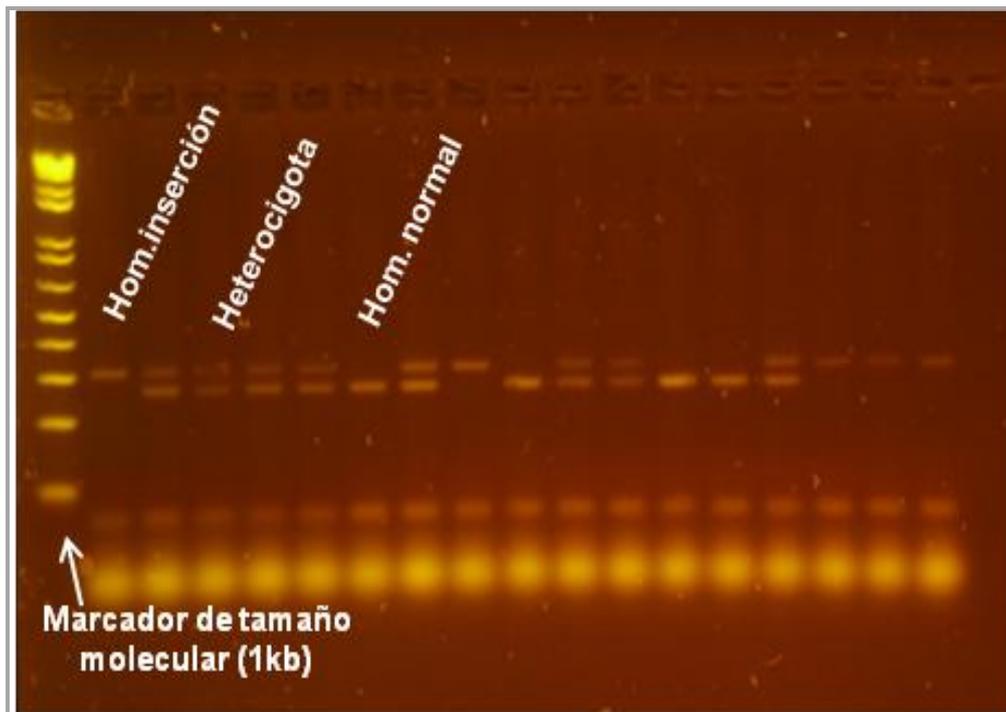


Figura 49.- Fotografía de un gel de agarosa al 2% de la PCR de la inserción de tamaño fijo de SLC6A4 para 17 de las muestras analizadas, se observa cómo cinco de ellas son homocigotas para la inserción (banda a 299 pb), ocho son heterocigotas (banda a 255 y 299 pb) y cuatro son homocigotas para el alelo normal sin inserción (banda a 255 pb), se han señalado tres de las muestras con su correspondiente genotipo.

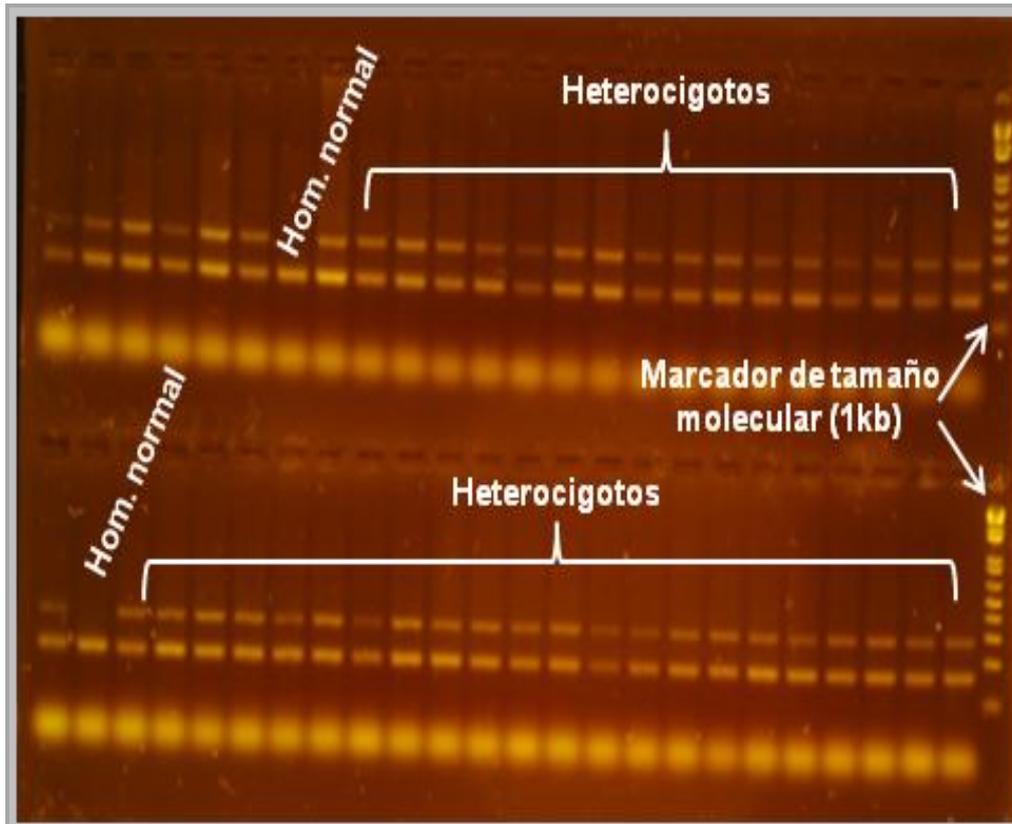


Figura 50.- Fotografía de un gel de agarosa al 2% de la PCR de la inserción de tamaño fijo de DRD4 para 48 de las muestras analizadas, como puede observarse el genotipo más frecuente para este reordenamiento es el heterocigoto (bandas a 159 pb y 280 pb). Se muestran también dos muestras homocigotas para el alelo normal de 159 pb.

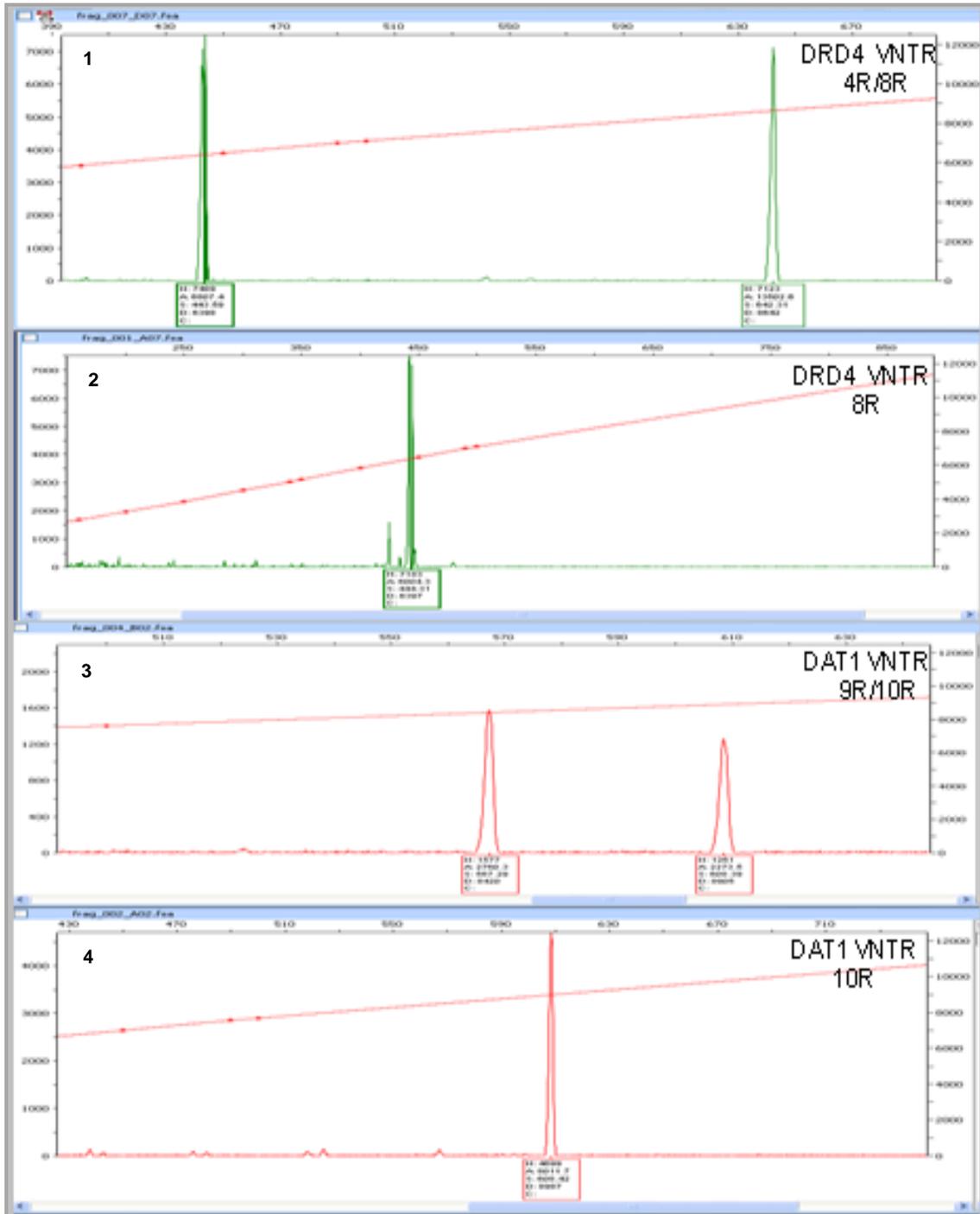


Figura 51.- Imágenes de los resultados de migración de 4 muestras en el analizador genético capilar tras el análisis con el software Peak Scanner Software v1.0. Las dos primeras gráficas corresponden a los fragmentos de amplificación de la VNTR de DRD4, los picos se ven en verde ya que están marcados con el fluoróforo VIC. La primera gráfica corresponde a una muestra heterocigota para 4R y 8R, mientras que la segunda corresponde a un individuo homocigoto para el alelo de 8R. Las gráficas 3 y 4 corresponden a la VNTR de DAT1 y se ven en rojo ya que están marcadas con el fluoróforo PET. La gráfica 3 muestra un individuo heterocigoto para los alelos de 9R y 10R y la 4 un paciente homocigoto para el alelo de 10R.

Tabla 48.- Tabla que resume los genotipos encontrados en las muestras analizadas para los dos reordenamientos y 2 VNTRs que se han genotipado. En las inserciones de tamaño fijo de SLC6A4 y DRD4 se muestran los resultados obtenidos tanto en los pacientes de TDAH como en las muestras control ya que ambos se asocian con diagnóstico de TDAH (Biederman et al. 2008; Brookes et al. 2006a y 2006b; Elia y Devoto 2007). En el caso de las VNTRs se muestran únicamente los datos de los pacientes con TDAH ya que se asocian con respuesta a tratamiento. Se ha seguido la siguiente codificación: en el genotipado de DRD4 todos los números de repeticiones obtenidos que no fueran 7R se han considerado como “normal”, ya que el de 7R es el que se ha asociado a respuesta a MTF (Hamarman et al. 2004). Del mismo modo, en la clasificación de los genotipos obtenidos de DAT1 se han considerado como normales los alelos con un número de repeticiones que no fuera 9R ó 10R, ya que en el caso de esta VNTR hay gran controversia en relación al alelo asociado con la respuesta a MTF y ambos han sido descritos en la bibliografía en distintas poblaciones (Contini et al. 2010; Froehlich et al. 2010; Kieling et al. 2010; Szobot et al. 2010).

| SLC6A4 (44 pb) | | |
|----------------|----------------|-----------|
| | Pacientes TDAH | Controles |
| Ins-Ins | 106 | 94 |
| Normal-Ins | 195 | 183 |
| Normal-Normal | 98 | 123 |
| Perdidos | 0 | 0 |

| DRD4 VNTR | |
|-----------|----------------|
| | Pacientes TDAH |
| N-N | 274 |
| 7R-7R | 13 |
| 7R-N | 112 |
| Perdidos | 0 |

| DRD4 (ins 120 pb) | | |
|-------------------|----------------|-----------|
| | Pacientes TDAH | Controles |
| Ins | 0 | 0 |
| Normal-Ins | 358 | 314 |
| Normal | 41 | 86 |
| Perdidos | 0 | 0 |

| DAT1 VNTR | |
|-----------|----------------|
| | Pacientes TDAH |
| 9R-9R | 54 |
| 9R-N | 10 |
| 10R-10R | 139 |
| 10R-N | 15 |
| 9R-10R | 147 |
| N-N | 15 |
| Perdidos | 19 |

2.6. ELABORACIÓN DE LA BASE DE DATOS CLÍNICOS

Una vez recogidos todos los CRDs de los pacientes participantes en el estudio, se procedió a elaborar una base de datos clínicos que contenía toda la información necesaria. Se intentó recuperar el máximo número de valores perdidos realizando monitorizaciones clínicas. Las dos características que permanecieron con mayor número de valores perdidos fueron la de tratamiento (12 valores perdidos) y el subtipo (16 valores perdidos). Por ello, la n de estudio varía en el análisis de los distintos fenotipos.

2.7. FILTRADO DE MUESTRAS Y POLIMORFISMOS PREVIO AL ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En primer lugar, de los 208 SNPs genotipados mediante Ensayo GoldenGate® se descartaron los SNPs con problemas de genotipado, que fueron un total de 15 SNPs (7,2% del total de SNPs genotipados) (Tabla 49). Este porcentaje de error está dentro de los valores normales para la plataforma Illumina Golden-Gate® y ninguno de ellos fue de los genotipados mediante PCR competitiva.

Tabla 49.- Tabla que recoge los 15 SNPs genotipados mediante la plataforma Illumina GoldenGate® descartados por error de genotipado. Se muestra tanto el código rs como el gen/locus en el que se localizan.

| Gen/ Locus | Código rs |
|------------|------------|
| DAT1 | rs28364997 |
| | rs11564758 |
| | rs2617605 |
| LOC728594 | rs2550956 |
| MAP3K7 | rs9451437 |
| NAPRT1 | rs2290416 |
| NRG3 | rs17746658 |
| HTR2A | rs7322347 |
| ARRB2 | rs1045280 |
| SLC6A4 | rs2066713 |
| CHRN4 | rs1044396 |
| | rs6011776 |
| | rs2273505 |
| MAOA | rs3027399 |
| SYP | rs3817678 |

A continuación, con los 193 SNPs restantes, se calculó el call-rate de las muestras y se eliminaron las muestras que tenían un call-rate <80%, es decir, muestras en las que se había genotipado con éxito menos de un 80% de los SNPs (Kim et al. 2009a). Se encontraron 45 muestras con un call-rate <80%, 44 de pacientes de TDAH y 1 control, lo que probablemente pudo deberse a que la calidad de estas muestras no era buena. Una vez eliminadas las muestras con call-rate <80%, se calculó el call-rate de los SNPs y se descartaron los SNPs con un call-rate

<80%, es decir, SNPs que se habían genotipado con éxito en menos de un 80% de las muestras (Kim et al. 2009a). Se encontraron 5 SNPs con call-rate <80% todos ellos genotipados mediante la plataforma Illumina Golden-Gate[®], estando este porcentaje dentro del margen de error intrínseco a la técnica (probablemente debido a un problema con los reactivos para el análisis de estos SNPs) y que se muestran en la Tabla 50, quedando, por tanto, 188 SNPs. Los 8 SNPs genotipados por PCR competitiva mostraron call-rate >80%; por ello no hubo que descartar ninguno para pasos posteriores.

Tabla 50.- Tabla que muestra los cinco SNPs genotipados con éxito en menos de un 80% de las muestras y que fueron descartados por ello para posteriores análisis. Se muestra tanto el código rs como el gen/locus en el que se localizan

| Gen/ Locus | Código rs |
|------------|-----------|
| OXER1 | rs930421 |
| PEMT | rs7946 |
| CHRNA4 | rs6090378 |
| | rs1044394 |
| AR | rs6152 |

Se analizó si los 196 SNPs (188 SNPs de GoldenGate[®] + 8 SNPs PCR competitiva) restantes con call-rate >80% estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE). Es decir, si las frecuencias de los tres genotipos para cada SNP en la población control coincidían con las esperadas. Se consideró que un SNP no estaba en HWE cuando la p del test era inferior a 0,0001 ($p < 0,0001$) en la población control (Hunt et al. 2008). Se encontró un SNP (rs2014572) que no estaba en HWE y fue descartado para análisis posteriores, ya que podría haber existido un problema en el genotipado de este SNP y que podría llevar a falsas asociaciones en el análisis estadístico.

A continuación se revisó si la lista final de 195 SNPs correctamente genotipados eran polimórficos (si existían al menos dos de los tres genotipos posibles). Se encontró un SNP monomórfico (sólo un genotipo) que se corresponde con el SNP con código rs2227847 y que, por tanto, se eliminó ya que no se puede utilizar como marcador para el estudio por no ser informativo.

Por todo lo descrito anteriormente, el análisis de asociación genotipo-fenotipo se ha llevado a cabo con 194 SNPs y 4 reordenamientos genómicos, además de con los resultados de metabolización de la atomoxetina obtenidos a partir del análisis con PHARMAchip[®].

Finalmente se realizó un análisis de desequilibrio de ligamiento (LD del inglés Linkage Disequilibrium) en cada cromosoma. En la Tabla 51 se muestran los grupos de SNPs que se encontraron en desequilibrio de ligamiento. En la Figura 52 se muestra la figura resultante del análisis de LD en el cromosoma 22, a modo de ejemplo. El color rosa fuerte indica que los SNPs están ligados y el azul que se heredan de forma independiente, la gama de colores intermedia indicaría un ligamiento parcial. Se han genotipado seis SNPs en el cromosoma 22 identificándose cinco tag-SNPs, ya que, como se muestra en la Figura 52, los SNPs rs6269 y rs4818 están ligados. De momento no se elimina ningún SNP del análisis, pero se seleccionarán aquéllos SNPs que muestren mayor asociación dentro de los que se encuentran ligados para la inclusión en los modelos.

Una vez que se realizó el filtrado previo de SNPs y muestras, se conjugó la base de datos de los genotipos con las variables de interés de la base de datos clínicos para realizar el análisis estadístico.

Tabla 51.- Tabla que recoge los grupos de SNPs que se encontraron en LD en cada cromosoma. Se muestra el código rs del SNP, el código interno que se les asignó, el grupo de LD, el gen al que pertenecen así como el cromosoma y la localización cromosómica exacta de cada uno de los SNPs. Se consideró que dos SNPs estaban en LD cuando el valor de R^2 de la correlación de sus genotipos es $>0,8$, límite aceptado comúnmente para considerar 2 SNPs en LD (Bosch et al. 2009).

| PGK_ID | Código rs | LD | Gen | Cromosoma | Localización |
|-------------|------------|---------------------|-----------|-----------|--------------|
| PGK_079 | rs463379 | PGK_079/080 | SLC6A3 | 5 | 1484164 |
| PGK_080 | rs460000 | PGK_079/080 | SLC6A3 | 5 | 1485825 |
| PGK_083 | rs2937639 | PGK_083/083-084/084 | SLC6A3 | 5 | 1496728 |
| PGK_084 | rs2652511 | PGK_083/083-084/084 | LOC728594 | 5 | 1499389 |
| PGK_083-084 | rs2975226 | PGK_083/083-084/084 | SLC6A3 | 5 | 1498616 |
| PGK_107 | rs1541665 | PGK_107/108 | KCNIP1 | 5 | 170075495 |
| PGK_108 | rs17673653 | PGK_107/108 | KCNIP1 | 5 | 170099172 |
| PGK_109 | rs686 | PGK_109/110 | DRD1 | 5 | 174801306 |
| PGK_110 | rs4532 | PGK_109/110 | DRD1 | 5 | 174802756 |
| PGK_111 | rs9687070 | PGK_111/113 | ADAMTS2 | 5 | 178501755 |
| PGK_113 | rs3776816 | PGK_111/113 | ADAMTS2 | 5 | 178507474 |
| PGK_370 | rs6269 | PGK_370/371 | COMT | 22 | 18329952 |
| PGK_371 | rs4818 | PGK_370/371 | COMT | 22 | 18331207 |
| PGK_291 | rs3785157 | PGK291_292_293 | SLC6A2 | 16 | 54287337 |
| PGK_292 | rs5569 | PGK291_292_293 | SLC6A2 | 16 | 54289336 |
| PGK_293 | rs998424 | PGK291_292_293 | SLC6A2 | 16 | 54289447 |

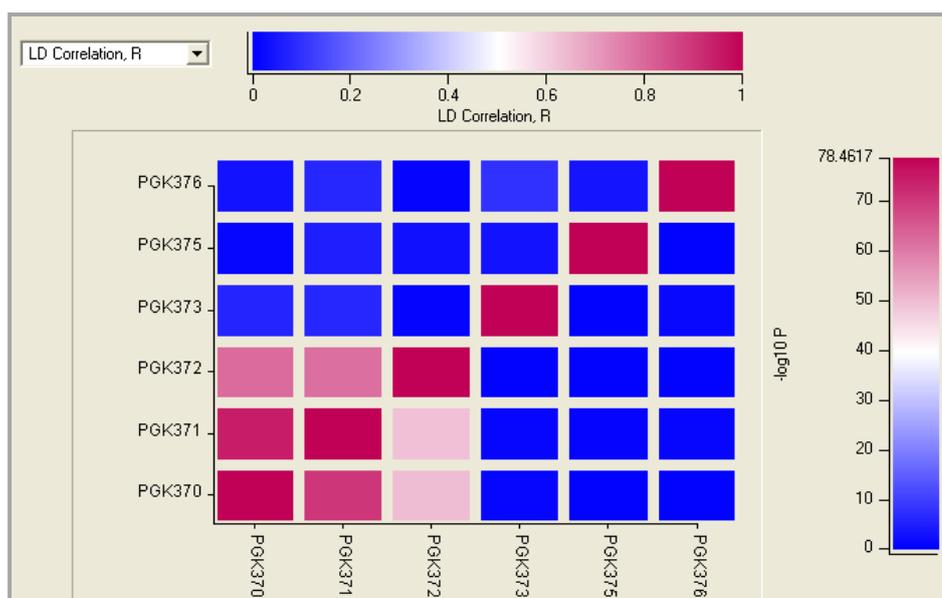


Figura 52.- Ejemplo de la figura resultante del análisis de LD en el cromosoma 22. El color rosa fuerte indica ligamiento entre los SNPs con código rs6269 (PGK_370) y rs4818 (PGK_371) localizados en este cromosoma.

2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

2.8.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO VARIABLES CLÍNICAS

El análisis descriptivo de las variables clínicas se realiza con la intención de conocer la distribución de los individuos en las distintas variables así como detectar posibles errores en la transcripción de datos y comprender mejor la relación entre variables predictoras y clase. Se han analizado las 399 muestras de pacientes de TDAH y 8 variables clínicas, tres de ellas predictoras (sexo, antecedentes personales asociados a TDAH y antecedentes psiquiátricos familiares) y el resto como variables clase o a predecir (severidad, subtipo, tratamiento, comorbilidad y normalización clínica de los síntomas).

2.8.1.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE VARIABLES CLÍNICAS: VARIABLES PREDICTORAS

Los resultados del análisis descriptivo de las variables clínicas predictoras sexo, antecedentes personales asociados a TDAH y antecedentes psiquiátricos familiares que se incluirán en los análisis multivariantes se muestran en las Figuras 53-55. En la variable predictora sexo se puede observar que la población está compuesta en un 79,4% de varones y en un 20,3% de mujeres. En la variable antecedentes personales asociados a TDAH se observa que la presencia de dichos antecedentes se da en un 64,2% de los pacientes, mientras que un 35,3% no los muestra. Ambas distribuciones (sexo y antecedentes) se ajustan a lo descrito en la bibliografía. Sin embargo, la presencia de antecedentes familiares de enfermedades psiquiátricas (8,8% de los pacientes analizados) es muy pequeña respecto a la publicada (Biederman et al.

1992). Esto podría ser debido a la pérdida de información, al desconocimiento de los familiares o al infradiagnóstico que podría existir en relación a enfermedades psiquiátricas. En la población de estudio la ausencia de estos antecedentes se cifra en un 91%.

| | | Frec. | % | % válido | % acumulado |
|----------|---------|-------|------|----------|-------------|
| Válidos | Varones | 317 | 79,4 | 79,6 | 79,6 |
| | Mujeres | 81 | 20,3 | 20,4 | 100,0 |
| | Total | 398 | 99,7 | 100,0 | |
| Perdidos | Sistema | 1 | ,3 | | |
| | Total | 399 | 100 | | |

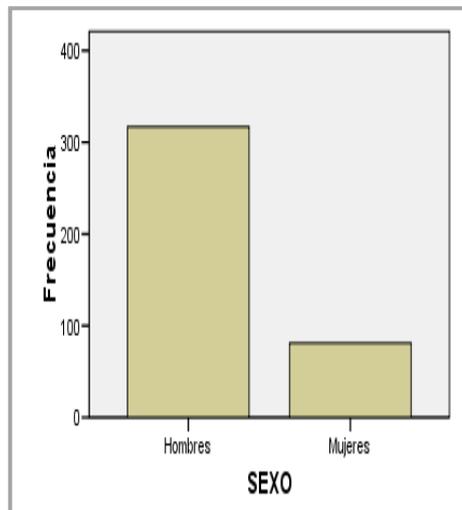


Figura 53.- Análisis descriptivo de la variable clínica predictor sexo. En la tabla se muestra la frecuencia de varones y mujeres, el porcentaje que cada grupo representa sobre el total, el porcentaje acumulado y el número de valores perdidos. En el diagrama de barras se representa la frecuencia de ambos grupos.

| | | Frec. | % | % válido | % acumulado |
|----------|-----------|-------|------|----------|-------------|
| Válidos | Ausencia | 141 | 35,3 | 35,5 | 35,5 |
| | Presencia | 256 | 64,2 | 64,5 | 100,0 |
| | Total | 397 | 99,5 | 100,0 | |
| Perdidos | Sistema | 2 | ,5 | | |
| | Total | 399 | 100 | | |

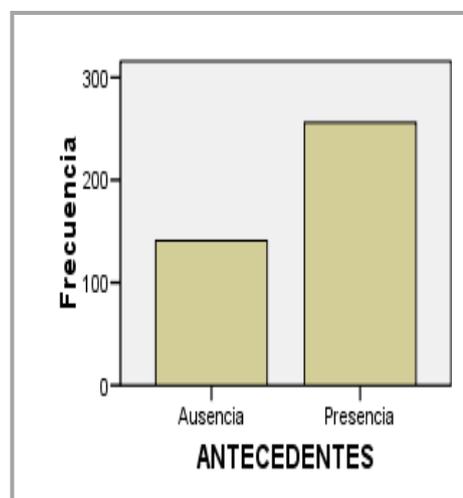


Figura 54.- Análisis descriptivo de la variable clínica predictor antecedentes personales asociados a TDAH. En la tabla se muestra la frecuencia de ausencia de antecedentes y presencia, el porcentaje que cada grupo representa sobre el total, el porcentaje acumulado y el número de valores perdidos. En el diagrama de barras se representa la frecuencia de ambos grupos.

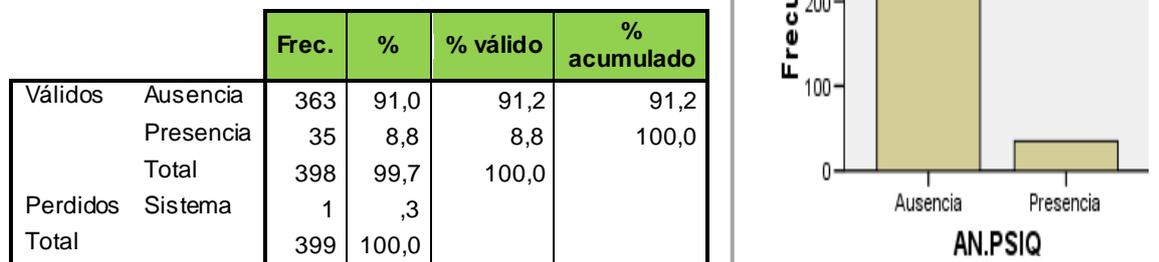


Figura 55.- Análisis descriptivo de la variable clínica predictora antecedentes familiares de enfermedades psiquiátricas. En la tabla se muestra la frecuencia de ausencia de antecedentes familiares de enfermedades psiquiátricas y presencia, el porcentaje que cada grupo representa sobre el total, el porcentaje acumulado y el número de valores perdidos. En el diagrama de barras se representa la frecuencia de ambos grupos.

2.8.1.2. ANÁLISIS DESCRIPTIVO VARIABLES CLÍNICAS: VARIABLES CLASE

En las Figuras 56-60 se muestran los resultados del análisis descriptivo de las variables clínicas clase subtipo, normalización clínica de los síntomas, severidad, presencia de comorbilidades y tratamiento actual, que son las variables que se intentarán predecir tanto en los análisis univariantes como multivariantes.

En la Figura 56 se puede observar cómo el subtipo combinado es el más numeroso (66,2%), seguido por el inatento (23,3%) y por último el hiperactivo/impulsivo que es el menos frecuente (6,5%), tal y como se presenta en la bibliografía (Herreros et al. 2002). En esta variable clase el número de valores perdidos es de 16. Respecto a la normalización clínica de los síntomas, como puede observarse en la Figura 57, el grupo de pacientes que muestra normalización clínica de los síntomas tras al menos dos años de seguimiento es superior (57,9%) al que continúa con sintomatología asociada al TDAH (39,1%) tras este periodo de tiempo, existiendo 12 pacientes para los que no se ha podido recuperar este dato (valores perdidos). La severidad de la sintomatología evaluada por el clínico según la escala ICG muestra dos grupos diferentes a los de la normalización clínica de los síntomas, como se muestra en la Figura 58. En esta variable el grupo denominado leve ($ICG < 3$) es muy superior (75,9%) al considerado más severo ($ICG \geq 3$) que se da en un 23,3% de los casos; el número de valores perdidos en esta variable es de 3. Como puede observarse en Figura 59, el número de pacientes que presentan al menos una comorbilidad asociada al TDAH (50,4%) es muy similar al que no presenta este tipo de trastornos comórbidos (48,9%). En la bibliografía se estima la presencia de comorbilidades en torno a un 30% de los pacientes de TDAH (Artigas-Pallarés 2003), por lo que la presencia de comorbilidades es mayor en la población de estudio a la referenciada en la bibliografía. En la Figura 60 se muestra el análisis descriptivo de la variable clínica clase tratamiento actual, donde

se agrupa a los pacientes de TDAH en función de si el tratamiento actual que están recibiendo es metilfenidato (71,4%), atomoxetina (9,8%), metilfenidato junto con otro fármaco (9,5%), atomoxetina junto con otro fármaco (0,5%), metilfenidato junto con atomoxetina (2,3%), otro tratamiento farmacológico (3%) o ningún tratamiento farmacológico (0,5%). Se observa claramente que el tratamiento mayoritario es el metilfenidato.

| | | Frec. | % | % válido | % acumulado |
|----------|-------------------|-------|------|----------|-------------|
| Válidos | Inatento | 93 | 23,3 | 24,3 | 24,3 |
| | Hiperac/impulsivo | 26 | 6,5 | 6,8 | 31,1 |
| | Combinado | 264 | 66,2 | 68,9 | 100,0 |
| | Total | 383 | 96,0 | 100,0 | |
| Perdidos | Sistema | 16 | 4,0 | | |
| Total | | 399 | 100 | | |

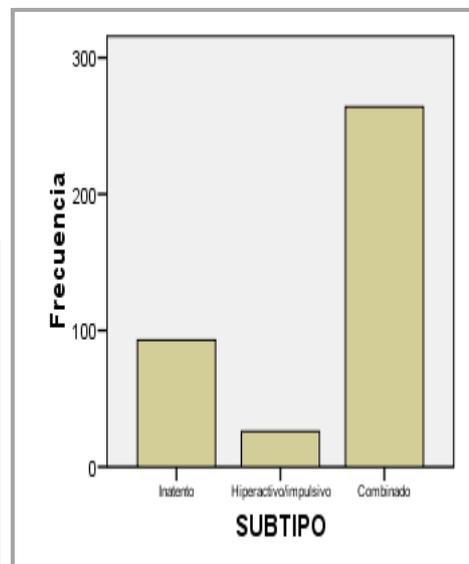


Figura 56.- Análisis descriptivo de la variable clínica clase subtipo. En la tabla se muestra la frecuencia de los tres subtipos, el porcentaje que cada grupo representa sobre el total, el porcentaje acumulado y el número de valores perdidos. En el diagrama de barras se representa la frecuencia de inatentos, hiperactivos/impulsivos y de los individuos con subtipo combinado por este orden.

| | | Frec. | % | % válido | % acumulado |
|----------|---------|-------|-------|----------|-------------|
| Válidos | malo | 156 | 39,1 | 40,3 | 40,3 |
| | bueno | 231 | 57,9 | 59,7 | 100,0 |
| | Total | 387 | 97,0 | 100,0 | |
| Perdidos | Sistema | 12 | 3,0 | | |
| Total | | 399 | 100,0 | | |

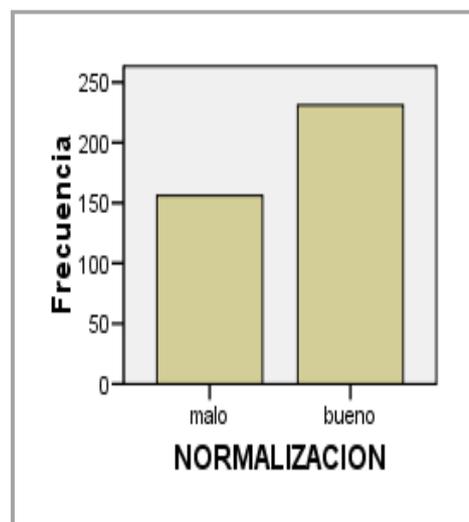


Figura 57.- Análisis descriptivo de la variable clínica clase normalización clínica de los síntomas. En la tabla se muestra la frecuencia de normalización clínica (codificado como bueno) y no normalización clínica (codificado como malo), el porcentaje que cada grupo representa sobre el total, el porcentaje acumulado y el número de valores perdidos. En el diagrama de barras se representa la frecuencia de ambos grupos.

| | | Frec. | % | % válido | % acumulado |
|----------|---------|-------|------|----------|-------------|
| Válidos | LEVE | 303 | 75,9 | 76,5 | 76,5 |
| | SEVERO | 93 | 23,3 | 23,5 | 100,0 |
| | Total | 396 | 99,2 | 100,0 | |
| Perdidos | Sistema | 3 | ,8 | | |
| Total | | 399 | 100 | | |

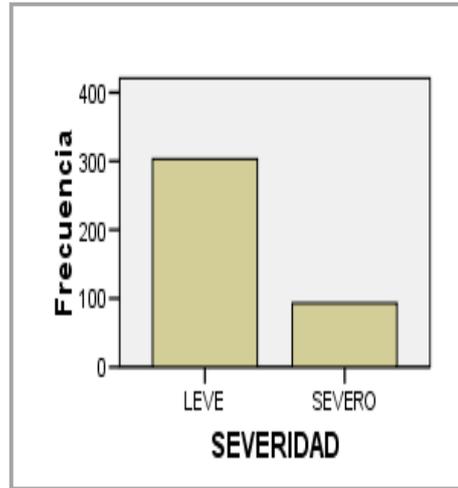


Figura 58.- Análisis descriptivo de la variable clínica clase severidad. En la tabla se muestra la frecuencia de fenotipo severo y fenotipo leve/asintomático evaluado según la escala ICG, el porcentaje que cada grupo representa sobre el total, el porcentaje acumulado y el número de valores perdidos. En el diagrama de barras se representa la frecuencia de ambos grupos.

| | | Frec. | % | % válido | % acumulado |
|----------|-----------|-------|------|----------|-------------|
| Válidos | AUSENCIA | 195 | 48,9 | 49,2 | 49,2 |
| | PRESENCIA | 201 | 50,4 | 50,8 | 100,0 |
| | Total | 396 | 99,2 | 100,0 | |
| Perdidos | Sistema | 3 | ,8 | | |
| Total | | 399 | 100 | | |

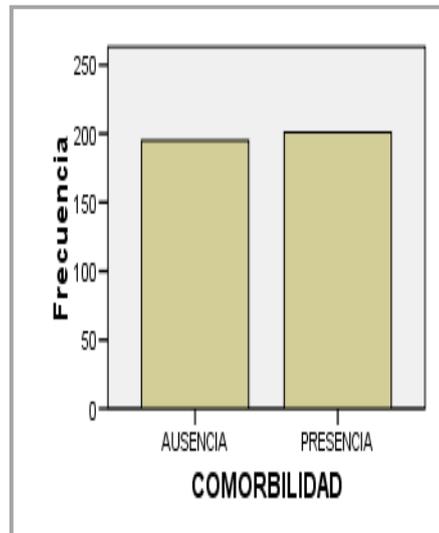


Figura 59.- Análisis descriptivo de la variable clínica clase comorbilidad. En la tabla se muestra la frecuencia de ausencia de comorbilidades y la presencia de una o más comorbilidades, el porcentaje que cada grupo representa sobre el total, el porcentaje acumulado y el número de valores perdidos. En el diagrama de barras se representa la frecuencia de ambos grupos.

| | | Frecuencia | % | % válido | % acumulado |
|----------|---------|------------|-------|----------|-------------|
| Válidos | MTH | 285 | 71,4 | 73,6 | 73,6 |
| | ATX | 39 | 9,8 | 10,1 | 83,7 |
| | MTH+OTR | 38 | 9,5 | 9,8 | 93,5 |
| | ATX+OTR | 2 | ,5 | ,5 | 94,1 |
| | MTH+ATX | 9 | 2,3 | 2,3 | 96,4 |
| | OTR | 12 | 3,0 | 3,1 | 99,5 |
| | NINGUNO | 2 | ,5 | ,5 | 100,0 |
| | Total | 387 | 97,0 | 100,0 | |
| Perdidos | Sistema | 12 | 3,0 | | |
| Total | | 399 | 100,0 | | |

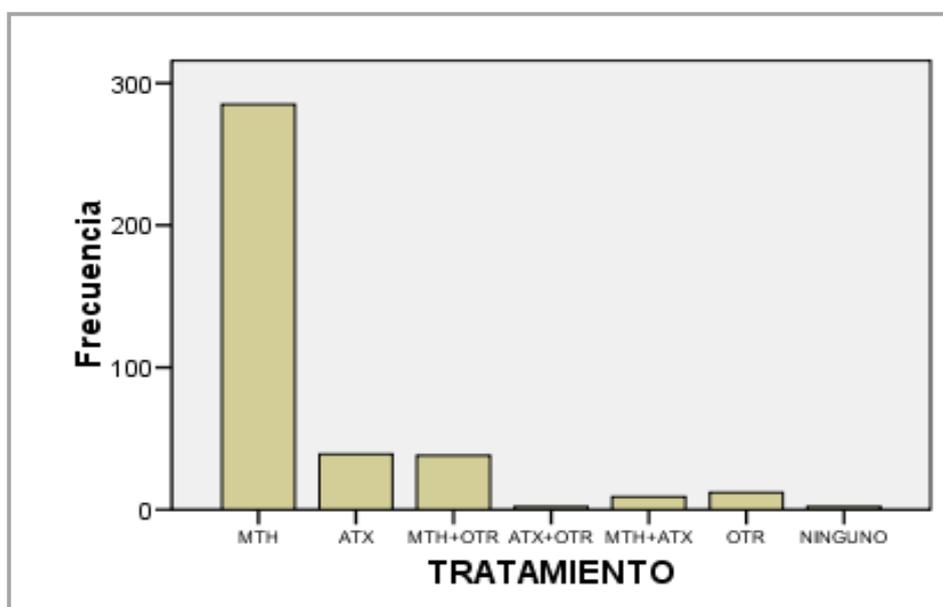


Figura 60.- Análisis descriptivo de la variable clínica clase tratamiento actual. En la tabla se muestra la frecuencia de tratados con metilfenidato, tratados con atomoxetina, con ambos, con otro tipo de tratamiento y los que no reciben tratamiento. Se muestra el porcentaje que cada grupo representa sobre el total, el porcentaje acumulado y el número de valores perdidos. En el diagrama de barras se representa la frecuencia de todos los grupos mencionados (MTH: metilfenidato; ATX: atomoxetina; MTH+OTR: metilfenidato junto con otro fármaco; ATX+OTR: atomoxetina junto con otro fármaco; MTH+ATX: metilfenidato y atomoxetina; OTR: otro fármaco y NINGUNO).

2.8.2. ANÁLISIS UNIVARIANTE DE ASOCIACIÓN

2.8.2.1. ANÁLISIS UNIVARIANTE DE ASOCIACIÓN: POLIMORFISMOS

En base a la información clínica de la que se disponía y las cuestiones de interés, se decidió analizar las asociaciones de genotipo con los siguientes fenotipos; normalización clínica de los síntomas, severidad, subtipo TDAH, presencia/ausencia de comorbilidad. Además se compararon las poblaciones de casos y controles para determinar si existían asociaciones con mayor riesgo de TDAH y se realizaron análisis de asociación de la respuesta a tratamiento valorándose la respuesta a MTF y a ATX.

En las tablas de resultados se muestran solamente aquellos SNPs significativos en la comparación de las frecuencias alélicas (valor de $p < 0,05$). A continuación se detalla los resultados obtenidos para cada una de las comparaciones realizadas y como puede observarse han sido numerosas las asociaciones individuales encontradas.

2.8.2.1.1. NORMALIZACIÓN CLÍNICA

Se seleccionaron aquellos SNPs significativos en el test de alelos al comparar los sujetos que presentaban normalización clínica de los síntomas asociados a TDAH ($n=210$) versus los que no presentaban dicha normalización ($n=144$) calculados según los puntos de corte que se detallan en el apartado de Sujetos, Materiales y Métodos. En la población del estudio, un 59,7% mostró normalización clínica, mientras que el 40,3% no mostró normalización clínica de la sintomatología asociada a TDAH.

Este análisis mostró que existían ocho SNPs asociados significativamente con esta variable en la población de estudio, tres de los cuales pertenecían al mismo gen, que codifica para el transportador de dopamina (SLC6A3/DAT1). El resto de SNPs pertenecían al gen que codifica para la subunidad $\alpha 1A$ del adrenoceptor (ADRA1A), el transportador de serotonina (SLC6A4), la proteína de 25 kDa asociada al sinaptosoma (SNAP25), para la dopamina β hidroxilasa y para dopa decarboxilasa (DDC). Los resultados se muestran en la Tabla 52 siendo estos SNPs los que se incluirán junto con las variables clínicas relevantes en el análisis multivariante.

Tabla 52.- Tabla que muestra el resultado del test de alelos, comparando normalización clínica versus no normalización clínica. Los SNPs están ordenados según su valor de significación, de los más significativos a los de mayor valor de p en el test de alelos. De cada SNP se muestra su código rs, el gen al que pertenecen, el cromosoma y la localización cromosómica, el valor de p chi-cuadrado de la comparación del test de alelos y de genotipos, el alelo que sería considerado como de riesgo de no normalización clínica de los síntomas y el odds ratio con su intervalo de confianza al 95%. Marcados en verde se muestran aquellos SNPs significativos tanto en el test de alelos como en el de genotipos.

| Código rs | Gen | Crom. | Localización | P Test alelos | P Test genotipos | Alelo riesgo | OR (IC 95%) |
|------------|--------|-------|--------------|---------------|------------------|--------------|------------------|
| rs10040882 | SLC6A3 | 5 | 1471558 | 0.00073 | 0.00255 | G | 1,89 (1,30-2,74) |
| rs250686 | SLC6A3 | 5 | 1478159 | 0.00259 | 0.00415 | A | 1,63 (1,18-2,23) |
| rs3808585 | ADRA1A | 8 | 26780243 | 0.00955 | 0.03669 | G | 1,62 (1,12-2,34) |
| rs1042173 | SLC6A4 | 17 | 25549137 | 0.01711 | 0.02790 | C | 1,45 (1,07-1,96) |
| rs27072 | SLC6A3 | 5 | 1447522 | 0.01796 | 0.02527 | C | 1,75 (1,10-2,79) |
| rs3787283 | SNAP25 | 20 | 10232418 | 0.02290 | 0.04802 | G | 1,45 (1,05-1,99) |
| rs2519152 | DBH | 9 | 135499455 | 0.03538 | 0.09226 | A | 1,40 (1,02-1,93) |
| rs2044859 | DDC | 7 | 50580056 | 0.03642 | 0.09267 | A | 1,41 (1,02-1,94) |

2.8.2.1.2. SEVERIDAD

En la población TDAH de estudio, el 38,1% de los sujetos presentaron puntuación ICG=1, el 38,4% ICG=2, el 15,9% ICG=3, el 4,5% ICG=4, el 2,0% ICG=5, el 0,8% ICG=6, el 0,3% ICG=7, por lo que el 76,5% de los sujetos TDAH mostraron sintomatología leve, y el 23,5% mostró una mayor severidad. El número de muestras que se han comparado en el análisis cuyos resultados se muestran a continuación, fue de 83 muestras, clasificadas de manera dicotómica como pertenecientes a sujetos con alta severidad de la sintomatología asociada a TDAH y 270 clasificadas como leves. Se compararon ambas poblaciones y se obtuvieron siete SNPs con una asociación estadísticamente significativa en el test de alelos, que se muestran en la Tabla 53, pertenecientes a siete genes distintos, tres de ellos muestran una asociación significativa de riesgo de mayor severidad tanto en el test de alelos como en el de genotipos (marcados en verde). Los genes en los que se localizan los SNPs significativos son los que codifican para una proteína similar a peptidasa de la membrana interna mitocondrial IMP2 (IMMP2L), para la subunidad 2B del receptor ionotrópico de glutamato (GRIN2B), para la proteína 5 responsable de unión a AMPc (CREB5), para la subunidad β 2 del adrenoceptor (ADRB2), para el transportador de glutamato de alta afinidad glial (SLC1A3), para la proteína 2 similar a toloide (TLL2) y para la desintegrina y metaloproteínasa, procolágeno I N-proteinasa (ADAMTS2).

Tabla 53.- Tabla que muestra el resultado del test de alelos y genotipos con el fenotipo severidad: alta (ICG \geq 3) versus baja (ICG \leq 2). Los siete SNPs están ordenados según su valor de significación estadística, de los más significativos a los de mayor valor de p en el test de alelos. De cada SNP se muestra su código rs, el gen al que pertenecen, el cromosoma y la localización cromosómica, el valor de p chi-cuadrado de la comparación del test de alelos y de genotipos, el alelo que sería considerado como de riesgo para una mayor severidad de los síntomas y el odds ratio con su intervalo de confianza al 95%. Marcados en verde se muestran aquellos SNPs significativos tanto en el test de alelos como en el de genotipos.

| Código rs | Gen | Crom. | Localización | P Test alelos | P Test genotipos | Alelo riesgo | OR (IC 95%) |
|------------|---------|-------|--------------|---------------|------------------|--------------|------------------|
| rs6968385 | IMMP2L | 7 | 109834707 | 0,00664 | 0,03097 | A | 1,64 (1,15-2,35) |
| rs2268115 | GRIN2B | 12 | 13760992 | 0,01160 | 0,00819 | A | 1,59 (1,11-2,28) |
| rs2237349 | CREB5 | 7 | 28729488 | 0,02850 | 0,06558 | A | 1,52 (1,04-2,22) |
| rs1042714 | ADRB2 | 5 | 148186666 | 0,02974 | 0,11339 | C | 1,50 (1,03-2,19) |
| rs2269272 | SLC1A3 | 5 | 36723613 | 0,03575 | 0,14825 | A | 1,55 (1,02-2,33) |
| rs10786284 | TLL2 | 10 | 98125495 | 0,03776 | 0,12770 | T | 1,46 (1,02-2,10) |
| rs10039254 | ADAMTS2 | 5 | 178503520 | 0,03839 | 0,00002 | A | 1,53 (1,02-2,30) |

2.8.2.1.3. SUBTIPO TDAH

Según la guía diagnóstica DSM-IV-TR se establecen tres subtipos dentro del TDAH: inatento, hiperactivo-impulsivo y combinado. El subgrupo hiperactivo-impulsivo es el menos frecuente y en la población recolectada el porcentaje de muestras de este subtipo es pequeño (6,8%) y por ello insuficiente para realizar un análisis estadístico robusto. Por lo tanto, se decidió agregar esta población a una de las otras dos. La combinación más lógica es unirlo al subtipo combinado (68,9%), ya que estos dos subtipos son más parecidos entre sí que con el inatento al compartir sintomatología. Por tanto, en este análisis se ha comparado el grupo inatentos ($n=88$) versus al grupo hiperactivos/impulsivos + combinados ($n=23 + n=228$, respectivamente). Se realizó también la comparativa contraria, el grupo de combinados ($n=228$) versus el grupo inatentos e hiperactivos/impulsivos ($n=88 + n=23$, respectivamente) juntos. Sin embargo, la tercera posibilidad (hiperactivo/impulsivos vs combinados+inatentos) no pudo realizarse debido al bajo número de pacientes hiperactivos/impulsivos.

En la primera comparativa se obtuvieron 10 SNPs significativos en el test de alelos asociados con el subtipo inatento, seis de los cuales muestran además asociación en el test de genotipos con valores de OR y e intervalos de confianza al 95% significativos. Estos 10 SNPs serán los que junto con las variables clínicas se incluyan en el análisis multivariante. Los resultados del test de alelos y genotipos de esta comparación se muestran en la Tabla 54. Los SNPs que no alcanzan significación estadística en el test de genotipos pertenecen a los genes que codifican para la monoaminooxidasa B (MAOB), el transportador de dopamina (SLC6A3/DAT1) y la carboxilesterasa 1 (CES1). Mientras que los significativos en ambos tests se localizan en genes pertenecientes principalmente a las vías de neurotransmisión y señalización celular, de serotonina y glutamato principalmente (SULF2, TPH2, GRIN2A y GRIK1). También un gen implicado en la codificación de la subunidad 1 de la proteína encargada del transporte de electrones en diversos procesos metabólicos (GFOD1) y una proteína de función desconocida que se expresa en cerebro pero también en otros tejidos (KIAA1486).

En la segunda comparación, en la que se analizan el grupo de subtipo combinado versus el grupo de inatentos e hiperactivos/impulsivos juntos, se obtuvieron 11 SNPs con valores de p significativos todos ellos en genes diferentes. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 55. Sólo cuatro de ellos mostraron también asociación en el test de genotipos, los que se localizan en el gen que codifica para el transportador de dopamina (SLC6A3/DAT1), para un transportador de glutamato (SLC1A3), para la proteína glypican 6 implicada en el control del crecimiento y división celular (GPC6) y para la integrina αE (ITGAE) proteína integral de la membrana plasmática. Los otros siete polimorfismos se encuentran localizados en genes de funciones diferentes como el metabolismo de catecolaminas (MAOB), neurotransmisión adrenérgica (ADRB2), vesículas sinápticas (SNAP25) entre otras.

Tabla 54.- Tabla que muestra el resultado del test alelos y genotipos para la variable subtipo de TDAH: inatento versus resto. Los 10 SNPs están ordenados de mayor a menor valor de significación estadística en el test de alelos. De cada SNP se muestra su código rs, el gen al que pertenecen, el cromosoma y la localización cromosómica, el valor de p chi-cuadrado de ambos tests, el alelo que de riesgo para el subtipo inatento de TDAH y el OR con su IC 95%. En verde aparecen aquellos SNPs significativos tanto en el test de alelos como en el de genotipos.

| Código rs | Gen | Crom. | Localización | P Test alelos | P Test genotipos | Alelo riesgo | OR (IC 95%) |
|------------|----------|-------|--------------|---------------|------------------|--------------|------------------|
| rs1799836 | MAOB | X | 43512943 | 0,00571 | 0,12111 | G | 1,65 (1,16-2,36) |
| rs4810685 | SULF2 | 20 | 45834120 | 0,01148 | 0,03479 | G | 1,57 (1,11-2,23) |
| rs4565946 | TPH2 | 12 | 70623036 | 0,01877 | 0,00685 | G | 1,52 (1,07-2,17) |
| rs5906213 | MAOB | X | 43654659 | 0,01880 | 0,09082 | G | 1,51 (1,07-2,15) |
| rs8049651 | GRIN2A | 16 | 9851167 | 0,01915 | 0,05088 | G | 1,61 (1,08-2,39) |
| rs1517484 | KIAA1486 | 2 | 225946154 | 0,02306 | 0,04253 | G | 1,51 (1,06-2,16) |
| rs27072 | SLC6A3 | 5 | 1447522 | 0,02630 | 0,07830 | T | 1,69 (1,06-2,71) |
| rs71647871 | CES1 | 16 | 54415071 | 0,02821 | 0,02772 | A | 8,39 (0,87-81,2) |
| rs363512 | GRIK1 | 21 | 29972688 | 0,03039 | 0,02364 | T | 2,40 (1,06-5,46) |
| rs552655 | GFOD1 | 6 | 13478467 | 0,04743 | 0,01167 | G | 1,42 (1,00-2,02) |

Tabla 55.- Tabla que muestra el resultado del test alelos y genotipos para la variable subtipo de TDAH: combinado versus resto. Los 11 SNPs están ordenados de mayor a menor valor de significación estadística en el test de alelos. De cada SNP se muestra su código rs, el gen al que pertenecen, el cromosoma y la localización cromosómica, el valor de p chi-cuadrado de ambos tests, el alelo de riesgo para el subtipo combinado de TDAH y el OR con su IC 95%. En verde aparecen aquellos SNPs significativos tanto en el test de alelos como en el de genotipos.

| Código rs | Gen | Crom. | Localización | P Test alelos | P Test genotipos | Alelo riesgo | OR (IC 95%) |
|-----------|----------|-------|--------------|---------------|------------------|--------------|------------------|
| rs27072 | SLC6A3 | 5 | 1447522 | 0,00437 | 0,01589 | C | 1,91 (1,22-2,98) |
| rs2269272 | SLC1A3 | 5 | 36723613 | 0,00534 | 0,03211 | A | 1,84 (1,19-2,84) |
| rs1799836 | MAOB | X | 43512943 | 0,00720 | 0,13518 | A | 1,58 (1,13-2,20) |
| rs7995215 | GPC6 | 13 | 93206507 | 0,00854 | 0,03465 | A | 1,57 (1,12-2,19) |
| rs220470 | ITGAE | 17 | 3611724 | 0,01019 | 0,02904 | G | 1,60 (1,12-2,29) |
| rs1042718 | ADRB2 | 5 | 148187110 | 0,01663 | 0,05461 | A | 1,70 (1,10-2,63) |
| rs864643 | MOBP | 3 | 39530584 | 0,01891 | 0,05836 | A | 1,62 (1,08-2,42) |
| rs3892715 | C3orf21 | 3 | 196239299 | 0,02174 | 0,07731 | G | 1,47 (1,06-2,05) |
| rs3787283 | SNAP25 | 20 | 10232418 | 0,02216 | 0,07008 | A | 1,48 (1,06-2,07) |
| rs1517484 | KIAA1486 | 2 | 225946154 | 0,03064 | 0,07477 | A | 1,44 (1,03-2,00) |
| rs2678787 | DSC3 | 18 | 26436326 | 0,03683 | 0,07112 | G | 1,54 (1,02-2,32) |

2.8.2.1.4. COMORBILIDAD

Se ha comparado el grupo de sujetos con presencia de comorbilidad (1 o más) (n=182) versus aquéllos con ausencia de comorbilidad (n=169) y se han obtenido 7 SNPs asociados significativamente en el test de alelos, dos de ellos pertenecen al gen que codifica para la neurotrofina 3 (NTF3) y otros dos al locus LOC728594, de función desconocida. Los otros tres SNPs asociados se localizan en el gen que codifica para la subunidad $\alpha 1A$ del adrenoceptor (ADRA1A), para el factor β de crecimiento nervioso y para la dopamina β hidroxilasa (DBH). De todos ellos, solamente los SNPs con código rs7956189 y rs2519152 localizados en los genes NTF3 y DBH han mostrado asociación significativa tanto en el test de alelos como en el de genotipos y serán los que se incluyan en el análisis multivariante (Tabla 56).

Tabla 56.- Tabla que muestra el resultado del test de alelos y genotipos para la variable comorbilidad: presencia versus ausencia. Los 7 SNPs están ordenados según su valor de significación estadística en el test de alelos, de los más significativos a los de mayor valor de p en el test de alelos. De cada SNP se muestra su código rs, el gen al que pertenecen, el cromosoma y la localización cromosómica, el valor de p chi-cuadrado de la comparación del test de alelos y de genotipos, el alelo que sería considerado como de riesgo/susceptibilidad para el subtipo combinado de TDAH y el odds ratio con su intervalo de confianza al 95%. Marcados en verde se muestran aquellos SNPs significativos tanto en el test de alelos como en el de genotipos.

| Código rs | Gen | Crom. | Localización | P Test alelos | P Test genotipos | Alelo riesgo | OR (IC 95%) |
|-----------|-----------|-------|--------------|---------------|------------------|--------------|------------------|
| rs7956189 | NTF3 | 12 | 5476122 | 0,01000 | 0,03304 | A | 1,78 (1,14-2,78) |
| rs6489630 | NTF3 | 12 | 5474885 | 0,03029 | 0,09061 | G | 1,53 (1,04-2,25) |
| rs2519152 | DBH | 9 | 135499455 | 0,03198 | 0,01544 | A | 1,41 (1,03-1,93) |
| rs3808585 | ADRA1A | 8 | 26780243 | 0,03383 | 0,10694 | G | 1,45 (1,02-2,06) |
| rs6330 | NGFB | 1 | 115630836 | 0,04178 | 0,11925 | A | 1,36 (1,01-1,84) |
| rs3756450 | LOC728594 | 5 | 1501148 | 0,04358 | 0,07806 | G | 1,59 (1,01-2,51) |
| rs2652511 | LOC728594 | 5 | 1499389 | 0,04456 | 0,08077 | A | 1,38 (1,01-1,90) |

2.8.2.1.5. CASO (TDAH) VS CONTROL

Se comparó el grupo de pacientes de TDAH (n=355 tras realizar el filtrado de muestras y eliminar aquéllas que dieron error en el genotipado) vs el de controles (n=399) y se obtuvieron las asociaciones estadísticamente significativas entre SNPs y riesgo/susceptibilidad a TDAH que se muestran en la Tabla 57. En total se obtuvieron 18 asociaciones con $p < 0,05$ en el test de alelos, 12 de las cuales también muestran una asociación estadísticamente significativa en el test de genotipos (marcadas en verde). Dos de las asociaciones se encuentran dentro del gen que codifica para la monoaminooxidasa B (MAOB), otras dos pertenecientes al gen que codifica para el factor de diferenciación neurogénica 6 (NEUROD6) y el resto en genes distintos pero localizados en los mismos cromosomas (cromosomas 5, 10, 12 y 16 principalmente). Éstos se encuentran en los genes que codifican para los receptores β -2-adrenérgicos y de serotonina 5HT1B (ADRB2 y

HTR1B), para el receptor D4 y transportador de dopamina (DRD4 y SLC6A3), para el receptor cannabinoide CB1 (CNR1), para diversas enzimas como la sulfatasa esteroidea microsomal, isoenzima S (STS), la triptófano hidroxilasa 2 (TPH2), la óxido nítrico sintasa 1 neuronal (NOS1) y la carboxil esterasa 1 (CES1). Además de dos genes que dan lugar a proteínas implicadas en la señalización celular como la cadherina 13 y la proteína similar a contactina (CDH13 y CNTNAP4). Finalmente también un gen que codifica un producto similar a un factor de transcripción mielínico (MYT1L) y otros dos loci con función desconocida como son hCG1818231 y C10orf79.

Tabla 57.- Tabla que muestra el resultado del test alelos y genotipos del análisis Caso (muestras de pacientes de TDAH) versus Control. Los SNPs están ordenados según su valor de significación estadística en el test de alelos, de los más significativos a los de mayor valor de p en el test de alelos. De cada SNP se muestra su código rs, el gen al que pertenecen, el cromosoma y la localización cromosómica, el valor de p chi-cuadrado de la comparación del test de alelos y de genotipos, el alelo que sería considerado como de riesgo/susceptibilidad a TDAH y el odds ratio con su intervalo de confianza al 95%. Marcados en verde se muestran aquellos SNPs significativos tanto en el test de alelos como en el de genotipos.

| Código rs | Gen | Crom | Localización | P Test alelos | P Test genotipos | Alelo riesgo | OR (IC 95%) |
|------------|------------|------|--------------|---------------|------------------|--------------|-------------------|
| rs1799836 | MAOB | X | 43512943 | 2,98E+00 | 0,00219 | G | 1,56 (1,27-1,92) |
| rs5906213 | MAOB | X | 43654659 | 0,00039 | 0,02880 | G | 1,45 (1,18-1,79) |
| rs6296 | HTR1B | 6 | 78228979 | 0,00279 | 0,00787 | G | 1,43 (1,13-1,80) |
| rs16928529 | hCG1818231 | 10 | 72652991 | 0,00420 | 0,01192 | C | 1,36 (1,10-1,68) |
| rs1042718 | ADRB2 | 5 | 148187110 | 0,00471 | 0,00117 | C | 1,47 (1,12-1,92) |
| rs4565946 | TPH2 | 12 | 70623036 | 0,00614 | 0,01271 | G | 1,33 (1,08-1,63) |
| rs478597 | NOS1 | 12 | 116235808 | 0,01022 | 0,00264 | G | 1,33 (1,07-1,65) |
| rs12861247 | STS | X | 7184199 | 0,01608 | 0,16815 | G | 1,67 (1,10-2,53) |
| rs2233404 | NEUROD6 | 7 | 31345458 | 0,01715 | 0,01587 | A | 1,30 (1,05-1,61) |
| rs71647871 | CES1 | 16 | 54415071 | 0,01997 | 0,01912 | C | 3,42 (1,14-10,28) |
| rs40184 | SLC6A3 | 5 | 1448077 | 0,02236 | 0,07224 | A | 1,28 (1,03-1,58) |
| rs13330107 | CNTNAP4 | 16 | 75436363 | 0,02343 | 0,07386 | G | 1,27 (1,03-1,57) |
| rs11594082 | CDH23 | 10 | 72969259 | 0,02442 | 0,02165 | C | 1,47 (1,05-2,06) |
| rs10238918 | NEUROD6 | 7 | 31343894 | 0,02516 | 0,05471 | A | 1,28 (1,03-1,59) |
| rs806368 | CNR1 | 6 | 88906819 | 0,02529 | 0,07660 | A | 1,31 (1,03-1,67) |
| rs2241685 | MYT1L | 2 | 1905000 | 0,03734 | 0,10053 | G | 1,5 (1,02-2,21) |
| rs515910 | C10orf79 | 10 | 105956394 | 0,04290 | 0,00968 | G | 1,24 (1,01-1,52) |
| Ins 120pb | DRD4 | 11 | -1,2kb prom | 0,04922 | 0,00025 | ins120 | 2,12 (1,41-3,17) |

2.8.2.1.6. RESPUESTA A METILFENIDATO

Los datos de respuesta a MTF que se recogieron en los CRDs fueron: tratamiento actual y tratamientos previos (para más información ver Anexo I). En muchos casos se incluye la dosis administrada (n=182) pero en otros no. Además, ésta depende del peso del paciente y no se disponía de esta información por lo que se analizó la asociación a buena/mala respuesta de forma general, sin tener en cuenta la dosis administrada como se describe en el apartado de Sujetos, Materiales y Métodos. Asimismo, es importante tener en cuenta que en numerosos pacientes se administró el MTF junto con otro fármaco, como se ha descrito en la Figura 60. Se han realizado varios tipos de análisis cuyos resultados se muestran a continuación:

2.8.2.1.6.1. Test alelos y genotipos SNPs y VNTRs Buena vs Mala Respuesta

En la Tabla 58 se muestran los resultados del test de alelos y genotipos del análisis de asociación individual entre buena (n=167) y mala respuesta a MTF (n=198). No se ha encontrado ningún polimorfismo asociado significativamente con la respuesta a MTF en nuestra población de pacientes de TDAH aunque sería destacable que la VNTR del receptor D4 de dopamina (DRD4) se encuentra cercana a la significación estadística en el test de alelos.

Tabla 58.- Tabla que muestra los resultados del test de alelos y genotipos del análisis de asociación individual de buena respuesta a metilfenidato (n=167) vs mala respuesta (n=198) para todos los polimorfismos analizados. Los polimorfismos están ordenados según su valor de significación estadística en el test de alelos, de los más significativos a los de mayor valor de p. De cada polimorfismo se muestra su código rs si se trata de un SNP, o el nombre del reordenamiento, el gen al que pertenece, el cromosoma y el valor de p chi-cuadrado del test de alelos y de genotipos.

| Polimorfismo | Gen | Cromosoma | P Test alelos | P Test genotipos |
|--------------|--------|-----------|---------------|------------------|
| VNTR | DRD4 | 11 | 0,077 | 0,182 |
| rs4680 | COMT | 22 | 0,106 | 0,226 |
| VNTR_10R | DAT1 | 5 | 0,256 | 0,464 |
| VNTR_9R | DAT1 | 5 | 0,290 | 0,420 |
| rs1800544 | ADRA2A | 10 | 0,319 | 0,434 |
| rs3746544 | SNAP25 | 20 | 0,681 | 0,512 |
| rs5569 | SLC6A2 | 16 | 0,694 | 0,522 |
| rs71647871 | CES1 | 16 | 0,884 | 0,888 |

Se han incluido en el análisis los cinco SNPs previamente asociados en la bibliografía con la respuesta a este fármaco y las dos VNTRs descritas anteriormente localizadas en el transportador y el receptor de dopamina (DAT1 y DRD4). En el caso de las VNTRs la comparación se ha realizado de la siguiente manera: en la VNTR de DRD4 el alelo que bibliográficamente se asocia con la respuesta a MTF es el de 7R, por lo que se han comparado los individuos con al menos un alelo de 7R frente al resto. En el caso de la VNTR de DAT1

existen referencias contradictorias sobre si el alelo asociado es el de 9R ó 10R por lo que se han realizado las dos comparaciones posibles: los individuos con al menos un alelo de 9R frente al resto y una segunda comparación de los pacientes con al menos un alelo de 10R frente al resto. En ningún caso se ha obtenido significación suficiente.

En concordancia con los resultados obtenidos en este análisis individual de asociación, no se realizó análisis multivariante de respuesta a metilfenidato ya que no se ha obtenido ningún SNP significativo con un valor de $p < 0,05$.

2.8.2.1.6.2. Test alelos y genotipos tratados con MTF vs tratados con MTF + Otro fármaco

Se ha realizado la comparación de los pacientes tratados en el momento de la recogida de la muestra únicamente con MTF (n=276) frente a los tratados con MTF y algún otro fármaco (n=46) para ver si existe alguna asociación con el genotipo. El resultado de este análisis se muestra en la Tabla 59 y puede observarse que no se encontró ningún polimorfismo asociado significativamente entre los ocho analizados.

En concordancia con los resultados obtenidos en este análisis individual de asociación, no se realizó análisis multivariante de respuesta a metilfenidato ya que no se ha obtenido ningún SNP significativo con un valor $p < 0,05$.

Tabla 59.- Tabla que muestra los resultados del test de alelos y genotipos del análisis de asociación individual de los pacientes tratados únicamente con MTF (n=276) frente a los tratados con MTF y algún otro fármaco (n=46) para todos los polimorfismos analizados. Los polimorfismos están ordenados según su valor de significación estadística en el test de alelos, de los más significativos a los de mayor valor de p. De cada polimorfismo se muestra su código rs si se trata de un SNP, o el nombre del reordenamiento, el gen al que pertenece, el cromosoma y el valor de p chi-cuadrado del test de alelos y de genotipos.

| Polimorfismo | Gen | Cromosoma | P Test alelos | P Test genotipos |
|--------------|--------|-----------|---------------|------------------|
| VNTR_10R | DAT1 | 5 | 0,117 | 0,105 |
| rs5569 | SLC6A2 | 16 | 0,200 | 0,197 |
| rs4680 | COMT | 22 | 0,209 | 0,427 |
| VNTR (7R) | DRD4 | 11 | 0,310 | 0,599 |
| rs71647871 | CES1 | 16 | 0,493 | 0,491 |
| VNTR_9R | DAT1 | 5 | 0,618 | 0,184 |
| rs1800544 | ADRA2A | 10 | 0,882 | 0,325 |
| rs3746544 | SNAP25 | 20 | 0,998 | 0,849 |

2.8.2.1.6.3. Test asociación genotipo DRD4 VNTR 7R/SLC6A4 LL con respuesta a MTF

En la bibliografía se ha asociado con mala respuesta a MTF (McGough et al. 2009) la combinación de al menos un alelo 7R de la VNTR de DRD4 con al menos un alelo con inserción (LL:alelo largo) de SLC6A4. En este análisis se ha comparado la respuesta a MTF calculada según la normalización clínica de los síntomas, excepto en el caso de pacientes tratados en el pasado con MTF y a los que se les cambió el tratamiento o los que reciben en la actualidad MTF más algún otro fármaco que se han considerado mala respuesta. En nuestra población, puede concluirse que no existe asociación significativa entre esta combinación de genotipos y la respuesta a MTF como puede observarse en la Tabla 60, ya que el valor de p que se obtiene en la prueba chi-cuadrado de Pearson al contrastar las hipótesis es de 0,271. En esta tabla además se muestran los valores válidos (n=336) y perdidos (n=32) del análisis y la distribución de los pacientes en buena (0) y mala respuesta a MTF (1).

Tabla 60.- Tabla compuesta de tres subtablas que muestran el resultado de la comparación alelo 7R DRD4+ alelo largo SLC6A4 vs respuesta MTF. En la primera tabla se muestra la descripción de los valores totales, válidos y perdidos en el análisis. En la segunda se muestra la tabla de contingencia entre las variables tipo de metabolizador y respuesta a MTF (rpta mtf1:0 es buena respuesta y rpta mtf1:1 es mala respuesta. Drd47R_slc6a4LL, 0 es ausencia de la combinación y 1 presencia). En la tercera tabla se presenta el resultado de las pruebas de chi-cuadrado del contraste de hipótesis (el valor de significación de la prueba de chi-cuadrado de Pearson se encuentra resaltado en color verde).

Resumen del procesamiento de los casos

| 1 | Casos | | | | | |
|---------------------------------|---------|------------|----------|------------|-------|------------|
| | Válidos | | Perdidos | | Total | |
| | N | Porcentaje | N | Porcentaje | N | Porcentaje |
| rpta_mtf_1 * drd47R_slc6a4LL | 336 | 91,3% | 32 | 8,7% | 368 | 100,0% |

Tabla de contingencia rpta_mtf_1 * drd47R_slc6a4LL

| Recuento | | drd47R_slc6a4LL | | Total |
|------------|---|-----------------|----|-------|
| | | 0 | 1 | |
| rpta_mtf_1 | 0 | 112 | 40 | 152 |
| | 1 | 145 | 39 | 184 |
| Total | | 257 | 79 | 336 |

Pruebas de chi-cuadrado

| 3 | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) | Sig. exacta (bilateral) | Sig. exacta (unilateral) |
|---------------------------------|--------------------|----|--------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | 1,213 ^b | 1 | ,271 | | |
| Corrección por continuidad | ,945 | 1 | ,331 | | |
| Razón de verosimilitudes | 1,209 | 1 | ,271 | | |
| Estadístico exacto de Fisher | | | | ,302 | ,165 |
| Asociación lineal por lineal | 1,210 | 1 | ,271 | | |
| N de casos válidos | 336 | | | | |

Además de estos estudios también se analizó la posible asociación de buena y mala respuesta con el SNP con código rs1800544 que se localiza en el gen ADRA2A solamente dentro del subtipo inatento (n=72), ya que existen estudios que postulan que el alelo G de este SNP se asocia con una mayor mejoría de los síntomas especialmente en el subtipo inatento (da Silva et al. 2008; Polanczyk et al. 2007). En la población de estudio no se encontró tal asociación (valor p test alelos=0,32, valor p test genotipos=0,53). Del mismo modo, en la bibliografía también se señala al SNP rs5569 localizado en el exón 9 del gen SLC6A2 que codifica para el transportador de noradrenalina como asociado a la respuesta a MTF únicamente en el subtipo hiperactivo-impulsivo (Yang et al. 2004), asociando al alelo G con una mayor mejoría sintomatológica. Por esta razón, se analizó la posible asociación con la buena/mala respuesta a MTF de este SNP solamente en el subtipo hiperactivo-impulsivo (n=20). Asimismo, no se obtuvo asociación estadísticamente significativa (valor p test de alelos=0,57, valor p test de genotipos=0,78).

2.8.2.1.7. RESPUESTA A ATOMOXETINA

Para el análisis de asociación entre el fenotipo metabolizador del CYP2D6 y la respuesta a ATX solamente se han podido utilizar las muestras de aquellos pacientes previamente tratados con atomoxetina (n= 58). Se han realizado varios tipos de análisis que se muestran a continuación.

2.8.2.1.7.1. Metabolizadores Ultrarrápidos + Normales vs Intermedios + Lentos

En esta comparación se ha analizado si existía una diferencia significativa en la respuesta a ATX entre los grupos de metabolizadores ultrarrápidos y normales (n=3 y n=24, respectivamente) frente a los intermedios y lentos (n=25 y n=4, respectivamente). Al grupo con fenotipo "normal o intermedio" se le ha excluido del análisis (n=2) por no poder clasificarlo con seguridad en ningún grupo. El resultado de asociación ha sido negativo, siendo el valor de p que se ha obtenido en la prueba de la chi-cuadrado de Pearson es de 0,534 lo que indica que no existen diferencias significativas entre estos dos grupos respecto a la respuesta a ATX. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 61, donde se muestran también los valores válidos y perdidos del análisis y la distribución de los pacientes en los grupos que se han comparado.

Tabla 61.- Tabla compuesta de 3 subtablas que muestran el resultado de la comparación metabolizadores ultrarrápidos + normales vs intermedios + lentos. En la primera tabla se muestra la descripción de los valores válidos y perdidos en el análisis. En la segunda se muestra la tabla de contingencia entre las variables tipo de metabolizador y respuesta a ATX y en la tercera el resultado de la pruebas de chi-cuadrado, estando señalado en color verde el valor p de la prueba de chi-cuadrado de Pearson.

Resumen del procesamiento de los casos

| 1 | Casos | | | | | |
|---------------------|---------|------------|----------|------------|-------|------------|
| | Válidos | | Perdidos | | Total | |
| | N | Porcentaje | N | Porcentaje | N | Porcentaje |
| metab_1 * rptaatx_1 | 56 | 96,6% | 2 | 3,4% | 58 | 100,0% |

Tabla de contingencia metab_1 * rptaatx_1

| Recuento | | rptaatx_1 | | Total |
|----------|---------------------|-----------------|----------------------------|-------|
| 2 | | buena respuesta | mala respuesta(2 fármacos) | |
| metab_1 | lento+intermedio | 12 | 17 | 29 |
| | normal+ultrarrápido | 9 | 18 | 27 |
| Total | | 21 | 35 | 56 |

Pruebas de chi-cuadrado

| 3 | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) | Sig. exacta (bilateral) | Sig. exacta (unilateral) |
|------------------------------|-------------------|----|-----------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | ,386 ^b | 1 | ,534 | | |
| Corrección por continuidad | ,119 | 1 | ,730 | | |
| Razón de verosimilitudes | ,387 | 1 | ,534 | | |
| Estadístico exacto de Fisher | | | | ,589 | ,365 |
| Asociación lineal por lineal | ,379 | 1 | ,538 | | |
| N de casos válidos | 56 | | | | |

2.8.2.1.7.2. Metabolizadores Ultrarrápidos vs Normales + Normales o Intermedios + Intermedios + Lentos

En esta comparación se analizó si existe una diferencia significativa en la respuesta a ATX entre los grupos de metabolizadores normales, normales o intermedios, intermedios y lentos (n=55) frente a los metabolizadores ultrarrápidos (n=3). La distribución de los pacientes así como los valores válidos y perdidos y los resultados se muestran a continuación en la Tabla 62. En este caso como en alguno de los subgrupos que se han comparado existen menos de 5 observaciones (ver tabla de contingencia en la Tabla 62), el valor en el que debemos fijarnos para determinar si existe asociación o no es el valor p del estadístico exacto de Fisher, éste valor es 1 (>0,05), por lo que no existe asociación estadísticamente significativa entre los subgrupos de metabolizadores analizados y la respuesta a ATX.

Tabla 62.- Tabla compuesta de tres subtablas que muestran el resultado de la comparación metabolizadores ultrarrápidos vs normales+normales o intermedios+intermedios+lentos. En la primera tabla se muestra la descripción de los valores válidos y perdidos en el análisis. En la segunda se muestra la tabla de contingencia entre las variables tipo de metabolizador y respuesta a ATX y en la tercera el resultado de las pruebas de chi-cuadrado, estando señalado en verde el valor p del estadístico exacto de Fisher, ya que dos de las observaciones son inferiores a 5 (el número de metabolizadores ultrarrápidos en buena y en mala respuesta es inferior a 5).

Resumen del procesamiento de los casos

| 1 | Casos | | | | | |
|---------------------|---------|------------|----------|------------|-------|------------|
| | Válidos | | Perdidos | | Total | |
| | N | Porcentaje | N | Porcentaje | N | Porcentaje |
| metab_3 * rptaatx_1 | 58 | 100,0% | 0 | ,0% | 58 | 100,0% |

Tabla de contingencia metab_3 * rptaatx_1

| 2 | | rptaatx_1 | | Total |
|---------|----------------|-----------------|----------------------------|-------|
| | | buena respuesta | mala respuesta(2 fármacos) | |
| metab_3 | ultrarrápido | 1 | 2 | 3 |
| | len+inter+norm | 20 | 35 | 55 |
| Total | | 21 | 37 | 58 |

Pruebas de chi-cuadrado

| 3 | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) | Sig. exacta (bilateral) | Sig. exacta (unilateral) |
|------------------------------|-------------------|----|-----------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | ,011 ^b | 1 | ,915 | | |
| Corrección por continuidad | ,000 | 1 | 1,000 | | |
| Razón de verosimilitudes | ,011 | 1 | ,915 | | |
| Estadístico exacto de Fisher | | | | 1,000 | ,705 |
| Asociación lineal por lineal | ,011 | 1 | ,916 | | |
| N de casos válidos | 58 | | | | |

2.8.2.1.7.3. Metabolizadores Lentos vs Ultrarrápidos + Normales + Intermedios

En esta comparación se analizó si existe una diferencia significativa en la respuesta a atomoxetina entre los grupos de metabolizadores normales, normales o intermedios, intermedios y ultrarrápidos (n=54) frente a los metabolizadores lentos (n=4), como se muestra en la Tabla 63, donde además se muestran los valores perdidos, la distribución de los pacientes en los subgrupos de la comparación y los resultados de las pruebas estadísticas realizadas. Como al menos una de las observaciones que se describen en la tabla de contingencia es menor a 5 (el número de metabolizadores lentos totales es de 4), debemos fijarnos en el valor p del estadístico exacto de Fisher para determinar si existe asociación estadísticamente significativa entre alguno

de los tipos de metabolizadores y la respuesta a ATX. Éste valor es 1 ($>0,05$) por lo que en la población de estudio no existe tal asociación.

Tabla 63.- Tabla compuesta de 3 subtablas que muestran el resultado de la comparación metabolizadores lentos vs ultrarrápidos+normales+normales o intermedios+intermedios. En la primera tabla se muestra la descripción de los valores válidos y perdidos en el análisis. En la segunda se muestra la tabla de contingencia entre las variables tipo de metabolizador y respuesta a atomoxetina y en la tercera el resultado de la pruebas de chi-cuadrado, estando señalado en color verde el valor p del estadístico exacto de Fisher.

Resumen del procesamiento de los casos

| 1 | Casos | | | | | |
|--------------------|---------|------------|----------|------------|-------|------------|
| | Válidos | | Perdidos | | Total | |
| | N | Porcentaje | N | Porcentaje | N | Porcentaje |
| metab_2 * rptaax_1 | 58 | 100,0% | 0 | ,0% | 58 | 100,0% |

Tabla de contingencia metab_2 * rptaax_1

| 2 | | rptaax_1 | | Total |
|---------|------------------|-----------------|----------------------------|-------|
| | | buena respuesta | mala respuesta(2 fármacos) | |
| metab_2 | lento | 1 | 3 | 4 |
| | inter+norm+ultra | 20 | 34 | 54 |
| Total | | 21 | 37 | 58 |

Pruebas de chi-cuadrado

| 3 | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) | Sig. exacta (bilateral) | Sig. exacta (unilateral) |
|------------------------------|-------------------|----|-----------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | ,234 ^b | 1 | ,629 | | |
| Corrección por continuidad | ,000 | 1 | 1,000 | | |
| Razón de verosimilitudes | ,246 | 1 | ,620 | | |
| Estadístico exacto de Fisher | | | | 1,000 | ,540 |
| Asociación lineal por lineal | ,230 | 1 | ,632 | | |
| N de casos válidos | 58 | | | | |

2.8.2.2. ANÁLISIS UNIVARIANTE DE ASOCIACIÓN: VARIABLES CLÍNICAS

El siguiente paso que se llevó a cabo fue el de realizar un análisis univariante de asociación entre las diferentes variables clínicas. Este tipo de análisis da una idea acerca de qué variable clínica tendrá más relevancia según la variable clase que se esté analizando, además de dar información sobre si existen variables que estén asociadas entre sí. Si esto ocurriera, en el análisis multivariante habría que seleccionar únicamente una de ellas.

La variable clínica antecedentes familiares de enfermedades psiquiátricas no se ha tenido en cuenta para los análisis ya que según los datos recogidos únicamente 35 pacientes mostraban antecedentes familiares de algún tipo de enfermedad psiquiátrica frente a 363 pacientes que no mostraban tales antecedentes. Esta distribución no se ajusta a lo descrito bibliográficamente y se consideró que no era representativo de la población real de pacientes de TDAH por lo que no se incluyó en los análisis de asociación. A continuación se muestran los resultados de los análisis de asociación univariantes realizados entre las variables predictoras (sexo y antecedentes personales asociados a TDAH) y las variables a predecir (normalización clínica de los síntomas, severidad, subtipo de TDAH, respuesta a MTF, respuesta a ATX y presencia/ausencia de comorbilidad).

VARIABLES CLÍNICAS ASOCIADAS ENTRE SÍ

- Normalización clínica de los síntomas con el sexo del paciente (n=397). En la población de estudio tras al menos dos años de seguimiento clínico los varones muestran una mayor normalización clínica de los síntomas que las mujeres (p=0,002).
- Normalización clínica de los síntomas con mayor/menor severidad de la sintomatología de TDAH calculada según al escala ICG (n=395). En la población de estudio una menor severidad se asocia con la normalización clínica de los síntomas (p<0,0005).
- Presencia de comorbilidad(es) parece estar asociada con una no normalización clínica de los síntomas en la población de estudio (n=395 y p<0,0005).
- Presencia de comorbilidad(es) se asocia con una mayor severidad de los síntomas del TDAH en la población de estudio (n=393 y p<0,0005).
- Normalización clínica de los síntomas con el subtipo de TDAH (n=382). En los análisis en los que se comparó el subtipo inatento frente al resto o al combinado frente al resto, se obtuvo significación estadística (p= 0,001 y p<0,005 respectivamente). En la población de estudio parece existir asociación entre pertenecer al subtipo inatento y mostrar una mayor normalización clínica de los síntomas tras al menos dos años de seguimiento clínico o pertenecer al subtipo combinado y mostrar no normalización. Sin embargo, en la comparación subtipo hiperactivo/impulsivo frente al resto no se obtuvo significación estadística (p=0,469) muy posiblemente debido a que los grupos comparados no se encuentran balanceados (hiperactivo/impulsivo=26, resto=356).
- Subtipo de TDAH con la presencia/ausencia de antecedentes personales asociados a TDAH (n=381). Cuando se compara al subtipo inatento frente al resto la asociación es significativa (p=0,007). Este subtipo se asocia con la ausencia de antecedentes asociados a TDAH. Sin embargo, al comparar los subtipos combinado e hiperactivo/impulsivo frente al resto, no se

obtiene significación estadística ($p=0,076$ y $0,18$ respectivamente). Se realizó un cuarto análisis en el que se eliminó al subtipo hiperactivo/impulsivo y el resultado fue de nuevo significativo ($p=0,041$).

- Respuesta a MTF con el subtipo de TDAH ($n=350$). Al comparar tanto al subtipo combinado frente al resto como al inatento frente al resto se obtuvieron asociaciones estadísticamente significativas ($p=0,005$ y $0,001$ respectivamente), asociándose una mala respuesta a MTF con el subtipo combinado de TDAH o una buena respuesta a MTF con el subtipo inatento. De nuevo en la comparación subtipo hiperactivo/impulsivo frente al resto se pierde la significación estadística ($p=0,572$); eliminando este subtipo del análisis el valor de significación que se obtiene es similar a la comparación del subtipo inatento frente al resto ($p=0,001$).

VARIABLES CLÍNICAS NO ASOCIADAS ENTRE SÍ

- Severidad de la sintomatología con el subtipo de TDAH ($n=380$). La asociación es cercana a la significación cuando se comparan al subtipo inatento frente al resto o al combinado frente al resto ($p=0,073$ y $0,054$ respectivamente). Si se compara al subtipo hiperactivo/impulsivo frente al resto se aleja de la significación estadística ($p=0,623$). Se realizó un cuarto análisis eliminando al subtipo hiperactivo/impulsivo pero no mejoró el resultado ($p=0,067$).
- Normalización clínica de los síntomas con la presencia/ausencia de antecedentes personales asociados a TDAH ($n=396$ y $p=0,828$).
- Severidad de la sintomatología con la presencia/ausencia de antecedentes asociados a TDAH ($n=394$ y $p=0,939$).
- Sexo con la severidad de la sintomatología ($n=394$ y $p=0,753$).
- Sexo con el subtipo de TDAH no mostró asociación en ninguna de las comparaciones realizadas ($n=382$), aunque cuando se compara al subtipo inatento frente al resto, el valor p de la prueba está cercano a la significación ($p=0,056$).
- Sexo con la presencia/ausencia de antecedentes asociados a TDAH ($n=396$ y $p=0,208$).
- Sexo con la presencia/ausencia de comorbilidad(es) ($n=395$ y $p=0,616$).
- Presencia/ausencia de comorbilidad(es) con la de antecedentes personales asociados a TDAH ($n=394$ y $p=0,453$).

- Presencia/ausencia de comorbilidad(es) con subtipo de TDAH (n=380) en ninguna de las comparaciones realizadas (inatento vs resto p= 0,135; hiperactivo vs resto p=0,432; combinado vs resto p=0,339).
- Presencia/ausencia de comorbilidad(es) con una peor respuesta a MTF (n=120 y p=0,398).
- Presencia/ausencia de antecedentes personales asociados a TDAH con la respuesta a MTF (n=363 y p=0,948).
- Presencia/ausencia de comorbilidad(es) con una peor respuesta a ATX (n=58 y p=0,136).
- Subtipo de TDAH con la respuesta a ATX (n=58 y p=0,553). Únicamente se tuvo en cuenta a los subtipos inatento y combinado, ya que ningún paciente del subtipo hiperactivo/impulsivo fue tratado con ATX en la población de estudio.
- Presencia/ausencia de antecedentes personales asociados a TDAH con la respuesta a ATX (n=58 y p=0,349).

2.8.3. ANÁLISIS MULTIVARIANTE

Se han realizado los análisis de asociación multivariante para cada uno de los fenotipos descritos en el apartado anterior conjugando las variables clínicas y los SNPs significativos en el análisis univariante ($p < 0,1$). En ninguno de ellos se ha obtenido un modelo lo suficientemente robusto. A continuación, se muestran los resultados de estos análisis de forma más detallada para el análisis multivariante del fenotipo normalización clínica de los síntomas, a modo de ejemplo. Para el resto de variables a predecir, se muestra en los apartados siguientes solamente el valor final de precisión de los modelos obtenido y el intervalo de confianza.

2.8.3.1. NORMALIZACIÓN CLÍNICA

Para este análisis se incluyeron las dos variables clínicas predictoras: sexo y antecedentes personales asociados a TDAH, y los SNPs que en el test de alelos del análisis univariante mostraron asociación significativa. El objetivo fue evaluar el poder predictivo de estas variables en conjunto. En la Tabla 52 se muestra la lista de estos SNPs.

2.8.3.1.1. MODELO HACIA DELANTE

El primer paso que se realizó fue el análisis de la variable normalización clínica siguiendo el modelo de inclusión de variantes hacia delante con las variables que se han descrito en el apartado anterior. En la Tabla 64 se muestra la tabla resumen de los modelos donde se debe prestar atención principalmente a dos parámetros, el número de pasos que se han llevado a cabo, que en este caso han sido tres, lo que indica que se han incluido tres variables en el modelo, y el valor de la R^2 de Nagelkerke, que indica la proporción de variabilidad en el conjunto

de datos que el modelo estadístico es capaz de explicar (cuanto más cercano a 1 sea mejor, indica que el modelo es capaz de explicar un porcentaje mayor de casos, siendo el máximo el 100% de los casos). En este modelo el valor de la R^2 es 0,146, por lo que solamente explicaría el 14,6% de la varianza.

A continuación, en la Tabla 65 se recogen los datos de las variables de la ecuación, aquí se observa cómo el modelo ha incluido tres variables que se corresponden con los SNPs con código rs10040882 (PGK075) y rs3808585 (PGK181) y la variable clínica sexo en el orden en el que se indican en la tabla. Además pueden observarse los parámetros más importantes en cada uno de los pasos para las variables introducidas y para la constante como son el exponente β , el error estándar y el intervalo de confianza al 95% entre otros.

Finalmente en la Figura 61 y en la Tabla 66 se muestran la imagen de la Curva ROC con las probabilidades obtenidas en el modelo y los datos del área bajo la curva (AUC) y del LR, a vez que las coordenadas de la curva (especificidad y sensibilidad del modelo). Estos puntos indican en conjunto la validez del modelo como se ha descrito en el apartado de Sujetos, Materiales y Métodos, este modelo no fue lo suficientemente robusto como puede observarse por sus valores de AUC=0,652; IC95%= 0,592-0,712 y LR= 1,92.

Tabla 64.- Tabla resumen del modelo hacia delante de la variable normalización clínica de los síntomas. Se muestran el número de pasos del modelo (en este caso tres), el valor de -2 log de la verosimilitud de cada paso, así como los valores de R^2 de Cox y Snell y de Nagelkerke para cada uno de los pasos. El modelo por lo tanto ha incluido tres variables.

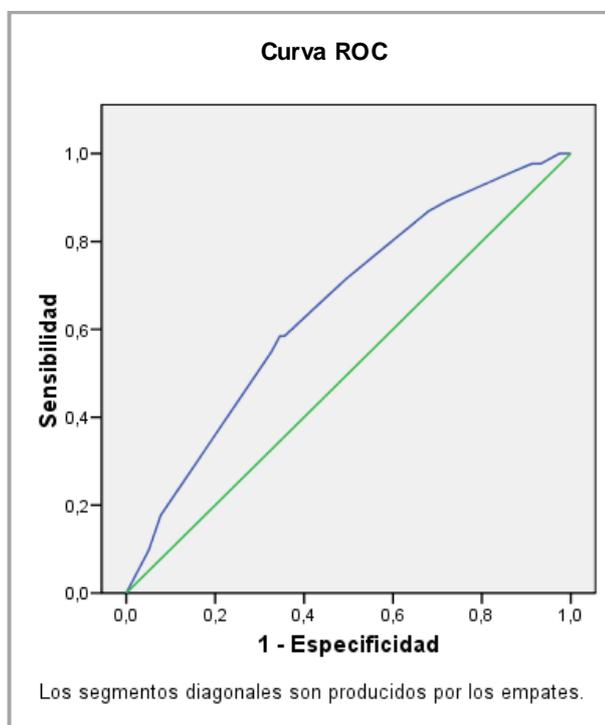
| Resumen de los modelos | | | |
|------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Paso | -2 log de la verosimilitud | R cuadrado de Cox y Snell | R cuadrado de Nagelkerke |
| 1 | 309,852 ^a | ,064 | ,086 |
| 2 | 304,424 ^a | ,085 | ,114 |
| 3 | 298,038 ^a | ,109 | ,146 |

a. La estimación ha finalizado en el número de iteración 5 porque las estimaciones de los parámetros han cambiado en menos de ,001.

Tabla 65.- Tabla que muestra las variables incluidas en la ecuación del modelo hacia delante de la variable clase normalización clínica de los síntomas. Los parámetros más importantes de esta tabla son el error estándar, el exponente β y el intervalo de confianza al 95%. Se muestran cada uno de ellos para las tres variables introducidas.

| Variables en la ecuación | | | | | | | | | |
|--------------------------|-----------|--------|-------|--------|------|-------|--------|------------------------|----------|
| | | B | E.T. | Wald | gl | Sig. | Exp(B) | I.C. 95,0% para EXP(B) | |
| | | | | | | | | Inferior | Superior |
| Paso 1 | pgk075 | | | 11,993 | 2 | ,002 | | | |
| | pgk075(1) | -2,582 | 1,056 | 5,974 | 1 | ,015 | ,076 | ,010 | ,600 |
| | pgk075(2) | -,746 | ,275 | 7,343 | 1 | ,007 | ,474 | ,276 | ,813 |
| | Constante | ,097 | ,180 | ,290 | 1 | ,590 | 1,102 | | |
| Paso 2 | sexo(1) | -,777 | ,336 | 5,330 | 1 | ,021 | ,460 | ,238 | ,889 |
| | pgk075 | | | 12,021 | 2 | ,002 | | | |
| | pgk075(1) | -2,581 | 1,061 | 5,918 | 1 | ,015 | ,076 | ,009 | ,606 |
| | pgk075(2) | -,762 | ,279 | 7,449 | 1 | ,006 | ,467 | ,270 | ,807 |
| Paso 3 | Constante | ,717 | ,328 | 4,782 | 1 | ,029 | 2,048 | | |
| | sexo(1) | -,852 | ,345 | 6,116 | 1 | ,013 | ,426 | ,217 | ,838 |
| | pgk075 | | | 11,499 | 2 | ,003 | | | |
| | pgk075(1) | -2,608 | 1,067 | 5,971 | 1 | ,015 | ,074 | ,009 | ,597 |
| | pgk075(2) | -,740 | ,283 | 6,830 | 1 | ,009 | ,477 | ,274 | ,831 |
| | pgk181 | | | 6,240 | 2 | ,044 | | | |
| | pgk181(1) | -,773 | ,577 | 1,799 | 1 | ,180 | ,461 | ,149 | 1,429 |
| | pgk181(2) | -,693 | ,298 | 5,407 | 1 | ,020 | ,500 | ,279 | ,897 |
| Constante | 1,074 | ,366 | 8,600 | 1 | ,003 | 2,926 | | | |

a. Variable(s) introducida(s) en el paso 1: pgk075.
 b. Variable(s) introducida(s) en el paso 2: sexo.
 c. Variable(s) introducida(s) en el paso 3: pgk181.



| | |
|--------|-------------|
| AUC | 0,652 |
| IC 95% | 0,592-0,712 |
| LR | 1,92 |

Figura 61.- Imagen de la curva ROC de la probabilidad pronosticada en el modelo hacia delante de la variable normalización clínica de los síntomas, en el eje de abscisas se representa (1 - especificidad) y en el de ordenadas la sensibilidad. En la tabla se muestran los valores del área bajo la curva (AUC), Intervalo de confianza (IC 95%) y el Likelihood ratio (LR).

Tabla 66.- Tabla que muestra los valores de las coordenadas de la curva ROC del modelo hacia delante de la variable clase normalización clínica de los síntomas en cuanto a sensibilidad y especificidad (1-especificidad).

| Variables resultado de contraste: Probabilidad pr | | |
|---|--------------|-------------------|
| Positivo si es mayor o igual que ^a | Sensibilidad | 1 - Especificidad |
| ,0000000 | 1,000 | 1,000 |
| ,0640990 | 1,000 | ,974 |
| ,0907992 | ,977 | ,933 |
| ,1373957 | ,977 | ,923 |
| ,1964797 | ,977 | ,912 |
| ,2225325 | ,962 | ,876 |
| ,2974437 | ,892 | ,722 |
| ,3693060 | ,869 | ,680 |
| ,3787676 | ,715 | ,495 |
| ,3880854 | ,585 | ,356 |
| ,4015808 | ,585 | ,345 |
| ,4831970 | ,546 | ,325 |
| ,5689266 | ,231 | ,113 |
| ,5884302 | ,177 | ,077 |
| ,6697102 | ,100 | ,052 |
| 1,0000000 | ,000 | ,000 |

2.8.3.1.2. MODELO HACIA ATRÁS

Del mismo modo se elaboró el modelo hacia atrás y a continuación se van a mostrar los resultados del análisis de la variable normalización clínica siguiendo el modelo de inclusión de variables hacia atrás con los SNPs significativos y variables clínicas que se han descrito al principio de este apartado. En la Tabla 67 se muestra la tabla resumen de los modelos donde se muestran principalmente el número de pasos que se han llevado a cabo (9 pasos) y el valor de la R^2 de Nagelkerke en cada uno de ellos, obteniéndose un valor final en el noveno paso de 0,146, por lo que, al igual que el modelo hacia delante, solamente explicaría el 14,6% de la varianza.

A continuación, en la Tabla 68 se recogen los datos de las variables de la ecuación y se observa cómo el modelo ha ido descartando variables hasta quedarse únicamente con tres variables que incluye, que son los SNPs con código rs10040882 (PGK075) y rs3808585 (PGK181) y la variable clínica sexo. Por ello, este modelo y el modelo hacia delante muestran el mismo resultado y la probabilidad pronosticada es la misma en ambos casos. Se pueden observar también los parámetros evaluados en cada uno de los pasos para las variables introducidas y para la constante como son el exponente β , el error estándar y el intervalo de confianza al 95% entre otros. Los resultados de la curva ROC (AUC, IC95%, LR y coordenadas de la curva) coinciden exactamente con los que han sido descritos para el modelo hacia delante en la Figura 61 y en la Tabla 66.

Tabla 67.- Tabla resumen del modelo hacia atrás de la variable normalización clínica de los síntomas. Se muestran el número de pasos del modelo (en este caso 9), el valor de -2 log de la verosimilitud de cada paso, así como los valores de R² de Cox y Snell y de Nagelkerke para cada uno de los pasos.

| Resumen de los modelos | | | |
|------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Paso | -2 log de la verosimilitud | R cuadrado de Cox y Snell | R cuadrado de Nagelkerke |
| 1 | 277,280 ^a | ,183 | ,246 |
| 2 | 277,408 ^a | ,183 | ,245 |
| 3 | 277,627 ^a | ,182 | ,244 |
| 4 | 279,004 ^a | ,177 | ,238 |
| 5 | 282,295 ^a | ,166 | ,223 |
| 6 | 285,605 ^a | ,154 | ,207 |
| 7 | 289,089 ^a | ,142 | ,190 |
| 8 | 293,685 ^a | ,125 | ,168 |
| 9 | 298,038 ^b | ,109 | ,146 |

a. La estimación ha finalizado en el número de iteración 20 porque se han alcanzado las iteraciones máximas. No se puede encontrar una solución definitiva.

b. La estimación ha finalizado en el número de iteración 5 porque las estimaciones de los parámetros han cambiado en menos de ,001.

Tabla 68.- Tabla que muestra paso a paso las variables que el modelo ha ido descartando y las tres finales que incluye en la ecuación del modelo hacia atrás para el fenotipo normalización clínica de los síntomas. Los parámetros más importantes de esta tabla son el error estándar, el exponente β y el intervalo de confianza al 95%, se muestran cada uno de ellos para las tres variables introducidas.

| Variables en la ecuación | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------|-------------|----------|-----------|----------|----------|----------|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|------------------------|--|
| Paso | | B | | ET. | | Wald | | gl | | Sig. | | Exp(B) | | I.C. 95,0% para EXP(B) | |
| | | Inferior | Superior | Inferior | Superior | Inferior | Superior | Inferior | Superior | Inferior | Superior | Inferior | Superior | | |
| Paso 1(a) | antecede(1) | 0,126 | 0,352 | 0,128 | 1 | 0,720 | 1,135 | 0,569 | 2,264 | | | | | | |
| | antfam(1) | 0,207 | 0,511 | 0,164 | 1 | 0,685 | 1,230 | 0,452 | 3,348 | | | | | | |
| | sexo(1) | -0,802 | 0,366 | 4,785 | 1 | 0,029 | 0,449 | 0,219 | 0,920 | | | | | | |
| | pgk075 | | | 3,134 | 2 | 0,209 | | | | | | | | | |
| | pgk075(1) | -1,835 | 1,174 | 2,443 | 1 | 0,118 | 0,160 | 0,016 | 1,594 | | | | | | |
| | pgk075(2) | -0,432 | 0,367 | 1,383 | 1 | 0,240 | 0,650 | 0,316 | 1,333 | | | | | | |
| | pgk07007 | | | 0,195 | 2 | 0,907 | | | | | | | | | |
| | pgk07007(1) | 20,341 | 14078,300 | 0,000 | 1 | 0,999 | 682257837,3 | 0,000 | | | | | | | |
| | pgk07007(2) | 20,191 | 14078,300 | 0,000 | 1 | 0,999 | 587075241,6 | 0,000 | | | | | | | |
| | pgk078 | | | 1,261 | 2 | 0,532 | | | | | | | | | |
| | pgk078(1) | 0,536 | 0,563 | 0,907 | 1 | 0,341 | 1,709 | 0,567 | 5,151 | | | | | | |
| | pgk078(2) | 0,100 | 0,437 | 0,053 | 1 | 0,818 | 1,106 | 0,470 | 2,602 | | | | | | |
| | pgk164 | | | 3,055 | 2 | 0,217 | | | | | | | | | |
| | pgk164(1) | 0,534 | 0,484 | 1,220 | 1 | 0,269 | 1,706 | 0,661 | 4,402 | | | | | | |
| | pgk164(2) | 0,007 | 0,472 | 0,000 | 1 | 0,988 | 1,007 | 0,399 | 2,538 | | | | | | |
| | pgk181 | | | 4,938 | 2 | 0,085 | | | | | | | | | |
| | pgk181(1) | -0,876 | 0,630 | 1,934 | 1 | 0,164 | 0,416 | 0,121 | 1,432 | | | | | | |
| | pgk181(2) | -0,651 | 0,328 | 3,943 | 1 | 0,047 | 0,522 | 0,274 | 0,992 | | | | | | |
| | pgk203 | | | 3,841 | 2 | 0,147 | | | | | | | | | |
| | pgk203(1) | 0,844 | 0,441 | 3,669 | 1 | 0,055 | 2,326 | 0,981 | 5,517 | | | | | | |
| pgk203(2) | 0,384 | 0,404 | 0,900 | 1 | 0,343 | 1,468 | 0,664 | 3,243 | | | | | | | |

Resultados

| | B | | ET. | | Wald | | gl | | Sig. | | Exp(B) | | I.C. 95,0% para EXP(B) | |
|--------------|-------------|-----------|-----------|----------|----------|----------|----------|-------------|-------------|----------|----------|----------|------------------------|--|
| | Inferior | Superior | Inferior | Superior | Inferior | Superior | Inferior | Superior | Inferior | Superior | Superior | Inferior | Superior | |
| Paso 2(a) | pgk310 | | | | 2,933 | | 2 | | 0,231 | | | | | |
| | pgk310(1) | -0,689 | 0,422 | 2,670 | | 1 | | 0,102 | | 0,502 | 0,220 | | 1,147 | |
| | pgk310(2) | -0,145 | 0,350 | 0,172 | | 1 | | 0,679 | | 0,865 | 0,435 | | 1,718 | |
| | pgk355 | | | 3,871 | | 2 | | 0,144 | | | | | | |
| | pgk355(1) | -0,865 | 0,474 | 3,326 | | 1 | | 0,068 | | 0,421 | 0,166 | | 1,067 | |
| | pgk355(2) | -0,442 | 0,474 | 0,869 | | 1 | | 0,351 | | 0,643 | 0,254 | | 1,627 | |
| | Constante | -19,681 | 14078,300 | 0,000 | | 1 | | 0,999 | | 0,000 | | | | |
| | antfam(1) | 0,235 | 0,504 | 0,218 | | 1 | | 0,641 | | 1,265 | 0,471 | | 3,400 | |
| | sexo(1) | -0,786 | 0,363 | 4,676 | | 1 | | 0,031 | | 0,456 | 0,224 | | 0,929 | |
| | pgk075 | | | 3,085 | | 2 | | 0,214 | | | | | | |
| | pgk075(1) | -1,795 | 1,168 | 2,363 | | 1 | | 0,124 | | 0,166 | 0,017 | | 1,638 | |
| | pgk075(2) | -0,439 | 0,366 | 1,435 | | 1 | | 0,231 | | 0,645 | 0,314 | | 1,322 | |
| | pgk07007 | | | 0,178 | | 2 | | 0,915 | | | | | | |
| | pgk07007(1) | 20,327 | 14131,742 | 0,000 | | 1 | | 0,999 | 672674628,9 | 0,000 | | | | |
| | pgk07007(2) | 20,183 | 14131,742 | 0,000 | | 1 | | 0,999 | 582771077,1 | 0,000 | | | | |
| | pgk078 | | | 1,285 | | 2 | | 0,526 | | | | | | |
| | pgk078(1) | 0,529 | 0,562 | 0,884 | | 1 | | 0,347 | | 1,697 | 0,564 | | 5,108 | |
| | pgk078(2) | 0,084 | 0,435 | 0,038 | | 1 | | 0,846 | | 1,088 | 0,464 | | 2,551 | |
| | pgk164 | | | 3,253 | | 2 | | 0,197 | | | | | | |
| | pgk164(1) | 0,554 | 0,481 | 1,325 | | 1 | | 0,250 | | 1,739 | 0,678 | | 4,463 | |
| pgk164(2) | 0,015 | 0,471 | 0,001 | | 1 | | 0,975 | | 1,015 | 0,403 | | 2,557 | | |
| pgk181 | | | 5,084 | | 2 | | 0,079 | | | | | | | |
| pgk181(1) | -0,867 | 0,630 | 1,898 | | 1 | | 0,168 | | 0,420 | 0,122 | | 1,443 | | |
| pgk181(2) | -0,665 | 0,326 | 4,163 | | 1 | | 0,041 | | 0,514 | 0,272 | | 0,974 | | |
| pgk203 | | | 3,757 | | 2 | | 0,153 | | | | | | | |
| pgk203(1) | 0,825 | 0,437 | 3,566 | | 1 | | 0,059 | | 2,283 | 0,969 | | 5,377 | | |
| pgk203(2) | 0,357 | 0,397 | 0,808 | | 1 | | 0,369 | | 1,429 | 0,656 | | 3,110 | | |
| pgk310 | | | 2,960 | | 2 | | 0,228 | | | | | | | |
| pgk310(1) | -0,688 | 0,421 | 2,665 | | 1 | | 0,103 | | 0,503 | 0,220 | | 1,148 | | |
| pgk310(2) | -0,136 | 0,349 | 0,151 | | 1 | | 0,697 | | 0,873 | 0,440 | | 1,730 | | |
| pgk355 | | | 3,793 | | 2 | | 0,150 | | | | | | | |
| pgk355(1) | -0,846 | 0,471 | 3,227 | | 1 | | 0,072 | | 0,429 | 0,170 | | 1,080 | | |
| pgk355(2) | -0,419 | 0,469 | 0,798 | | 1 | | 0,372 | | 0,658 | 0,262 | | 1,649 | | |
| Constante | -19,667 | 14131,742 | 0,000 | | 1 | | 0,999 | | 0,000 | | | | | |
| sexo(1) | -0,776 | 0,362 | 4,579 | | 1 | | 0,032 | | 0,460 | 0,226 | | 0,937 | | |
| pgk075 | | | 3,006 | | 2 | | 0,223 | | | | | | | |
| pgk075(1) | -1,777 | 1,167 | 2,318 | | 1 | | 0,128 | | 0,169 | 0,017 | | 1,667 | | |
| pgk075(2) | -0,429 | 0,366 | 1,375 | | 1 | | 0,241 | | 0,651 | 0,318 | | 1,333 | | |
| pgk07007 | | | 0,150 | | 2 | | 0,928 | | | | | | | |
| pgk07007(1) | 20,303 | 14116,326 | 0,000 | | 1 | | 0,999 | 657065558,2 | 0,000 | | | | | |
| pgk07007(2) | 20,172 | 14116,326 | 0,000 | | 1 | | 0,999 | 576172268,1 | 0,000 | | | | | |
| pgk078 | | | 1,367 | | 2 | | 0,505 | | | | | | | |
| pgk078(1) | 0,536 | 0,562 | 0,909 | | 1 | | 0,340 | | 1,709 | 0,568 | | 5,148 | | |
| pgk078(2) | 0,077 | 0,435 | 0,032 | | 1 | | 0,859 | | 1,080 | 0,461 | | 2,534 | | |
| pgk164 | | | 3,161 | | 2 | | 0,206 | | | | | | | |
| pgk164(1) | 0,535 | 0,479 | 1,245 | | 1 | | 0,265 | | 1,707 | 0,667 | | 4,369 | | |
| pgk164(2) | 0,003 | 0,471 | 0,000 | | 1 | | 0,995 | | 1,003 | 0,398 | | 2,527 | | |
| pgk181 | | | 5,563 | | 2 | | 0,062 | | | | | | | |
| pgk181(1) | -0,895 | 0,624 | 2,056 | | 1 | | 0,152 | | 0,409 | 0,120 | | 1,389 | | |
| pgk181(2) | -0,687 | 0,322 | 4,540 | | 1 | | 0,033 | | 0,503 | 0,267 | | 0,946 | | |
| pgk203 | | | 3,753 | | 2 | | 0,153 | | | | | | | |
| pgk203(1) | 0,818 | 0,436 | 3,523 | | 1 | | 0,061 | | 2,267 | 0,964 | | 5,328 | | |
| pgk203(2) | 0,337 | 0,394 | 0,733 | | 1 | | 0,392 | | 1,401 | 0,647 | | 3,031 | | |
| pgk310 | | | 2,964 | | 2 | | 0,227 | | | | | | | |
| pgk310(1) | -0,690 | 0,421 | 2,690 | | 1 | | 0,101 | | 0,501 | 0,220 | | 1,144 | | |
| pgk310(2) | -0,143 | 0,349 | 0,169 | | 1 | | 0,681 | | 0,866 | 0,437 | | 1,716 | | |
| pgk355 | | | 3,593 | | 2 | | 0,166 | | | | | | | |
| pgk355(1) | -0,798 | 0,459 | 3,022 | | 1 | | 0,082 | | 0,450 | 0,183 | | 1,107 | | |
| pgk355(2) | -0,375 | 0,459 | 0,668 | | 1 | | 0,414 | | 0,687 | 0,280 | | 1,689 | | |

Resultados

| | | B | | Wald | gl | Sig. | Exp(B) | | I.C. 95,0% para EXP(B) | |
|-----------|-------------|----------|-----------|-------|-------|-------|-------------|----------|------------------------|----------|
| | | Inferior | Superior | | | | Inferior | Superior | Inferior | Superior |
| Paso 4(a) | Constante | -19,447 | 14116,326 | 0,000 | 1 | 0,999 | 0,000 | | | |
| | sexo(1) | -0,760 | 0,360 | 4,441 | 1 | 0,035 | 0,468 | 0,231 | 0,948 | |
| | pgk075 | | | 7,139 | 2 | 0,028 | | | | |
| | pgk075(1) | -2,042 | 1,097 | 3,465 | 1 | 0,063 | 0,130 | 0,015 | 1,114 | |
| | pgk075(2) | -0,655 | 0,306 | 4,579 | 1 | 0,032 | 0,519 | 0,285 | 0,946 | |
| | pgk07007 | | | 0,232 | 2 | 0,890 | | | | |
| | pgk07007(1) | 20,453 | 13997,990 | 0,000 | 1 | 0,999 | 763221794,8 | 0,000 | | |
| | pgk07007(2) | 20,290 | 13997,990 | 0,000 | 1 | 0,999 | 648705042,0 | 0,000 | | |
| | pgk164 | | | 3,258 | 2 | 0,196 | | | | |
| | pgk164(1) | 0,524 | 0,470 | 1,241 | 1 | 0,265 | 1,689 | 0,672 | 4,246 | |
| | pgk164(2) | -0,017 | 0,464 | 0,001 | 1 | 0,970 | 0,983 | 0,396 | 2,441 | |
| | pgk181 | | | 4,907 | 2 | 0,086 | | | | |
| | pgk181(1) | -0,842 | 0,614 | 1,883 | 1 | 0,170 | 0,431 | 0,129 | 1,434 | |
| | pgk181(2) | -0,627 | 0,316 | 3,936 | 1 | 0,047 | 0,534 | 0,288 | 0,992 | |
| | pgk203 | | | 4,114 | 2 | 0,128 | | | | |
| | pgk203(1) | 0,852 | 0,434 | 3,849 | 1 | 0,050 | 2,345 | 1,001 | 5,494 | |
| | pgk203(2) | 0,350 | 0,393 | 0,794 | 1 | 0,373 | 1,420 | 0,657 | 3,068 | |
| | pgk310 | | | 3,302 | 2 | 0,192 | | | | |
| | pgk310(1) | -0,698 | 0,417 | 2,804 | 1 | 0,094 | 0,497 | 0,220 | 1,126 | |
| | pgk310(2) | -0,095 | 0,344 | 0,076 | 1 | 0,783 | 0,909 | 0,463 | 1,785 | |
| pgk355 | | | 3,346 | 2 | 0,188 | | | | | |
| pgk355(1) | -0,745 | 0,453 | 2,711 | 1 | 0,100 | 0,475 | 0,195 | 1,153 | | |
| pgk355(2) | -0,323 | 0,454 | 0,506 | 1 | 0,477 | 0,724 | 0,297 | 1,763 | | |
| Paso 5(a) | Constante | -19,410 | 13997,990 | 0,000 | 1 | 0,999 | 0,000 | | | |
| | sexo(1) | -0,762 | 0,360 | 4,491 | 1 | 0,034 | 0,467 | 0,231 | 0,944 | |
| | pgk075 | | | 7,929 | 2 | 0,019 | | | | |
| | pgk075(1) | -2,263 | 1,085 | 4,353 | 1 | 0,037 | 0,104 | 0,012 | 0,872 | |
| | pgk075(2) | -0,650 | 0,303 | 4,580 | 1 | 0,032 | 0,522 | 0,288 | 0,947 | |
| | pgk07007 | | | 0,257 | 2 | 0,879 | | | | |
| | pgk07007(1) | 20,367 | 13991,546 | 0,000 | 1 | 0,999 | 700301294,1 | 0,000 | | |
| | pgk07007(2) | 20,197 | 13991,546 | 0,000 | 1 | 0,999 | 590916541,1 | 0,000 | | |
| | pgk181 | | | 4,887 | 2 | 0,087 | | | | |
| | pgk181(1) | -0,759 | 0,604 | 1,578 | 1 | 0,209 | 0,468 | 0,143 | 1,530 | |
| | pgk181(2) | -0,640 | 0,314 | 4,165 | 1 | 0,041 | 0,527 | 0,285 | 0,975 | |
| | pgk203 | | | 3,666 | 2 | 0,160 | | | | |
| | pgk203(1) | 0,786 | 0,428 | 3,379 | 1 | 0,066 | 2,195 | 0,949 | 5,074 | |
| | pgk203(2) | 0,303 | 0,387 | 0,613 | 1 | 0,434 | 1,354 | 0,634 | 2,889 | |
| | pgk310 | | | 3,218 | 2 | 0,200 | | | | |
| | pgk310(1) | -0,664 | 0,413 | 2,589 | 1 | 0,108 | 0,515 | 0,229 | 1,156 | |
| | pgk310(2) | -0,061 | 0,342 | 0,032 | 1 | 0,858 | 0,941 | 0,481 | 1,841 | |
| | pgk355 | | | 3,332 | 2 | 0,189 | | | | |
| | pgk355(1) | -0,740 | 0,454 | 2,655 | 1 | 0,103 | 0,477 | 0,196 | 1,162 | |
| | pgk355(2) | -0,316 | 0,453 | 0,488 | 1 | 0,485 | 0,729 | 0,300 | 1,770 | |
| Paso 6(a) | Constante | -19,095 | 13991,546 | 0,000 | 1 | 0,999 | 0,000 | | | |
| | sexo(1) | -0,766 | 0,356 | 4,623 | 1 | 0,032 | 0,465 | 0,231 | 0,935 | |
| | pgk075 | | | 7,848 | 2 | 0,020 | | | | |
| | pgk075(1) | -2,389 | 1,089 | 4,811 | 1 | 0,028 | 0,092 | 0,011 | 0,776 | |
| | pgk075(2) | -0,606 | 0,300 | 4,085 | 1 | 0,043 | 0,546 | 0,303 | 0,982 | |
| | pgk07007 | | | 0,358 | 2 | 0,836 | | | | |
| | pgk07007(1) | 20,275 | 14038,205 | 0,000 | 1 | 0,999 | 638650307,9 | 0,000 | | |
| | pgk07007(2) | 20,076 | 14038,205 | 0,000 | 1 | 0,999 | 523453809,5 | 0,000 | | |
| | pgk181 | | | 6,421 | 2 | 0,040 | | | | |
| | pgk181(1) | -0,898 | 0,589 | 2,320 | 1 | 0,128 | 0,408 | 0,128 | 1,294 | |
| | pgk181(2) | -0,708 | 0,309 | 5,245 | 1 | 0,022 | 0,493 | 0,269 | 0,903 | |
| | pgk203 | | | 3,817 | 2 | 0,148 | | | | |
| | pgk203(1) | 0,809 | 0,424 | 3,645 | 1 | 0,056 | 2,245 | 0,979 | 5,149 | |
| | pgk203(2) | 0,356 | 0,381 | 0,873 | 1 | 0,350 | 1,428 | 0,676 | 3,016 | |
| | pgk355 | | | 3,438 | 2 | 0,179 | | | | |
| | pgk355(1) | -0,760 | 0,454 | 2,801 | 1 | 0,094 | 0,468 | 0,192 | 1,139 | |

Resultados

| | B | ET. | | Wald | gl | Sig. | Exp(B) | I.C. 95,0% para EXP(B) | | |
|-------------|---|-----------|-----------|--------|-------|-------|-------------|------------------------|----------|-------|
| | | Inferior | Superior | | | | | Inferior | Superior | |
| Paso 7(a) | pgk355(2) | -0,342 | 0,451 | 0,577 | 1 | 0,448 | 0,710 | 0,293 | 1,718 | |
| | Constante | -19,175 | 14038,205 | 0,000 | 1 | 0,999 | 0,000 | | | |
| | sexo(1) | -0,782 | 0,354 | 4,890 | 1 | 0,027 | 0,457 | 0,229 | 0,915 | |
| | pgk075 | | | 8,169 | 2 | 0,017 | | | | |
| | pgk075(1) | -2,356 | 1,083 | 4,731 | 1 | 0,030 | 0,095 | 0,011 | 0,792 | |
| | pgk075(2) | -0,629 | 0,297 | 4,491 | 1 | 0,034 | 0,533 | 0,298 | 0,954 | |
| | pgk07007 | | | 0,338 | 2 | 0,845 | | | | |
| | pgk07007(1) | 20,415 | 13655,162 | 0,000 | 1 | 0,999 | 735001796,1 | 0,000 | . | |
| | pgk07007(2) | 20,224 | 13655,162 | 0,000 | 1 | 0,999 | 606914997,5 | 0,000 | . | |
| | pgk181 | | | 6,128 | 2 | 0,047 | | | | |
| | pgk181(1) | -0,853 | 0,580 | 2,166 | 1 | 0,141 | 0,426 | 0,137 | 1,327 | |
| | pgk181(2) | -0,680 | 0,304 | 5,006 | 1 | 0,025 | 0,507 | 0,279 | 0,919 | |
| | pgk203 | | | 4,511 | 2 | 0,105 | | | | |
| | Paso 8(a) | pgk203(1) | 0,870 | 0,419 | 4,304 | 1 | 0,038 | 2,386 | 1,049 | 5,427 |
| pgk203(2) | | 0,381 | 0,377 | 1,021 | 1 | 0,312 | 1,464 | 0,699 | 3,065 | |
| Constante | | -19,806 | 13655,162 | 0,000 | 1 | 0,999 | 0,000 | | | |
| sexo(1) | | -0,815 | 0,345 | 5,567 | 1 | 0,018 | 0,443 | 0,225 | 0,871 | |
| pgk075 | | | | 9,040 | 2 | 0,011 | | | | |
| pgk075(1) | | -2,366 | 1,084 | 4,768 | 1 | 0,029 | 0,094 | 0,011 | 0,785 | |
| pgk075(2) | | -0,680 | 0,292 | 5,411 | 1 | 0,020 | 0,506 | 0,286 | 0,898 | |
| pgk07007 | | | | 0,301 | 2 | 0,860 | | | | |
| pgk07007(1) | | 20,183 | 14134,379 | 0,000 | 1 | 0,999 | 582505242,1 | 0,000 | . | |
| pgk07007(2) | | 20,004 | 14134,379 | 0,000 | 1 | 0,999 | 487056251,9 | 0,000 | . | |
| pgk181 | | | | 6,355 | 2 | 0,042 | | | | |
| pgk181(1) | | -0,805 | 0,577 | 1,946 | 1 | 0,163 | 0,447 | 0,144 | 1,386 | |
| pgk181(2) | | -0,700 | 0,301 | 5,423 | 1 | 0,020 | 0,497 | 0,276 | 0,895 | |
| Constante | | -19,085 | 14134,379 | 0,000 | 1 | 0,999 | 0,000 | | | |
| Paso 9(a) | sexo(1) | -0,852 | 0,345 | 6,116 | 1 | 0,013 | 0,426 | 0,217 | 0,838 | |
| | pgk075 | | | 11,499 | 2 | 0,003 | | | | |
| | pgk075(1) | -2,608 | 1,067 | 5,971 | 1 | 0,015 | 0,074 | 0,009 | 0,597 | |
| | pgk075(2) | -0,740 | 0,283 | 6,830 | 1 | 0,009 | 0,477 | 0,274 | 0,831 | |
| | pgk181 | | | 6,240 | 2 | 0,044 | | | | |
| | pgk181(1) | -0,773 | 0,577 | 1,799 | 1 | 0,180 | 0,461 | 0,149 | 1,429 | |
| | pgk181(2) | -0,693 | 0,298 | 5,407 | 1 | 0,020 | 0,500 | 0,279 | 0,897 | |
| | Constante | 1,074 | 0,366 | 8,600 | 1 | 0,003 | 2,926 | | | |
| | Variable(s) introducida(s) en el paso 1: antecede, anfam, sexo, pgk075, pgk07007, pgk078, pgk164, | | | | | | | | | |
| | a pgk181, pgk203, pgk310, pgk355. | | | | | | | | | |

Como se ha mostrado en los dos apartados anteriores, para el fenotipo de no normalización clínica no se obtuvo ningún modelo multivariante cuya precisión fuese de al menos AUC=0,75. En el modelo hacia delante los valores fueron AUC=0,652 (IC95%: 0,592-0,712) y en el modelo hacia atrás AUC=0,652 (IC95%: 0,592-0,712).

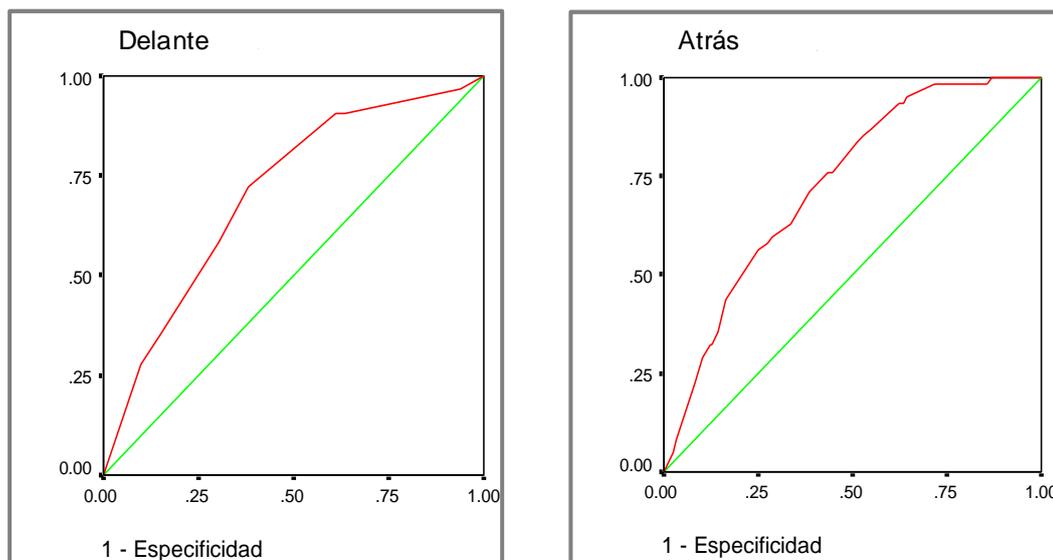
En los demás análisis multivariantes para el resto de fenotipos de estudio se va a mostrar solamente el resultado del modelo de forma resumida, indicando el AUC y el IC95%.

2.8.3.2. SEVERIDAD

Para el análisis multivariante de la variable severidad se incluyeron las variables clínicas: sexo y antecedentes personales asociados a TDAH y los SNPs significativos mostrados en la

Tabla 53. El objetivo fue evaluar el poder predictivo de estas variables en conjunto, de la misma forma que se ha mostrado para la variable normalización clínica de los síntomas.

Para este fenotipo no se obtuvo ningún modelo multivariante cuya precisión fuese de al menos $AUC=0,75$. Los valores obtenidos en el modelo hacia delante fueron el $AUC=0,706$ (IC95%: 0,637-0,775) y en el modelo hacia atrás $AUC=0,730$ (IC95%: 0,665-0,794). En la Figura 62 pueden verse estos resultados, además de las representaciones gráficas de las curvas ROC de ambos modelos.



| | delante | atrás |
|--------|-------------|-------------|
| AUC | 0,706 | 0,73 |
| IC 95% | 0,637-0,775 | 0,665-0,794 |

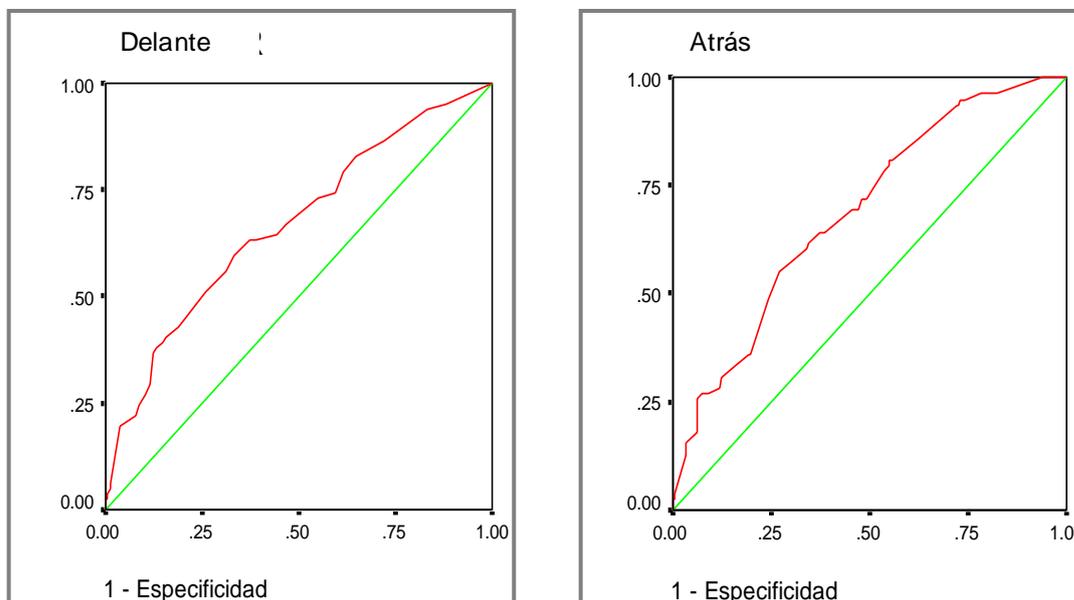
Figura 62.- Imagen de la curva ROC de la probabilidad pronosticada en el modelo hacia delante y hacia atrás de la variable severidad, en el eje de abscisas se representa (1-especificidad) y en el de ordenadas la sensibilidad. En la tabla se muestran los valores del área bajo la curva (AUC) y el Intervalo de confianza (IC 95%).

2.8.3.3. SUBTIPO TDAH

2.8.3.3.1. SUBTIPO INATENTO VERSUS HIPERACTIVO / IMPULSIVO + COMBINADO

Para el análisis multivariante se incluyeron las variables clínicas: sexo y antecedentes personales asociados a TDAH y los SNPs significativos mostrados en la Tabla 54, con el objetivo de evaluar el poder predictivo de estas variables en conjunto.

Para este fenotipo no se obtuvo ningún modelo multivariante cuya precisión fuese de al menos $AUC=0,75$. Para el modelo hacia delante el valor de AUC fue $0,667$ ($IC_{95\%}$: $0,596-0,737$) y para el modelo hacia atrás el valor de AUC fue igual a $0,688$ ($IC_{95\%}$: $0,622-0,755$) (Figura 63).



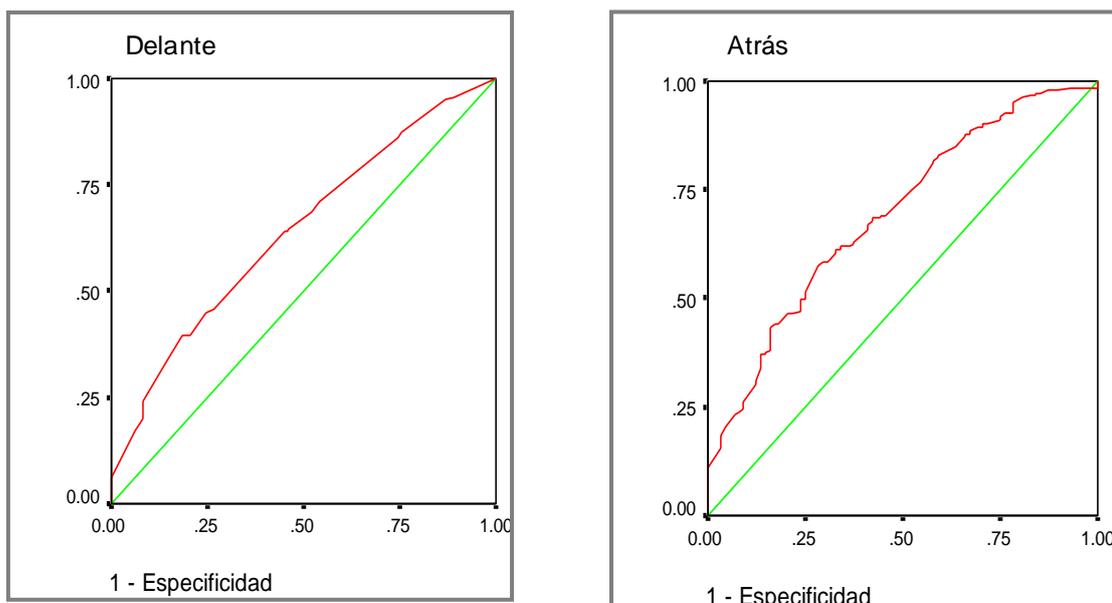
| | delante | atrás |
|--------|-------------|-------------|
| AUC | 0,667 | 0,688 |
| IC 95% | 0,596-0,737 | 0,622-0,755 |

Figura 63.- Imagen de la curva ROC de la probabilidad pronosticada en el modelo hacia delante y hacia atrás de la variable subtipo, realizando la comparación subtipo Inatento vs Hiperactivo/Impulsivo+Combinado. En el eje de abscisas se representa (1-especificidad) y en el de ordenadas la sensibilidad. En la tabla se muestran los valores del área bajo la curva (AUC) y el Intervalo de confianza ($IC_{95\%}$).

2.8.3.3.2. SUBTIPO COMBINADO VERSUS HIPERACTIVO / IMPULSIVO + INATENTO

Para el análisis multivariante se incluyeron las variables clínicas: sexo, antecedentes personales asociados a TDAH, y antecedentes familiares de enfermedades psiquiátricas, y los SNPs significativos en el análisis univariante mostrados en la Tabla 55, con el objetivo de evaluar el poder predictivo de estas variables en conjunto.

Para este fenotipo no se obtuvo ningún modelo multivariante cuya precisión fuese de al menos $AUC=0,75$. El modelo hacia delante mostró un $AUC=0,641$ ($0,577-0,706$) y el modelo hacia atrás mostró un $AUC=0,691$ ($IC_{95\%}$: $0,625-0,757$) (Figura 64).



| | delante | atrás |
|---------------|----------------|--------------|
| AUC | 0,641 | 0,691 |
| IC 95% | 0,577-0,706 | 0,625-0,757 |

Figura 64.- Imagen de la curva ROC de la probabilidad pronosticada en el modelo hacia delante y hacia atrás de la variable subtipo, realizando la comparación subtipo Combinado vs Hiperactivo/Impulsivo+Inatento. En el eje de abscisas se representa (1-especificidad) y en el de ordenadas la sensibilidad. En la tabla se muestran los valores del área bajo la curva (AUC) y el Intervalo de confianza (IC 95%).

2.8.3.4. COMORBILIDAD

Para el análisis multivariante de la variable comorbilidad se incluyeron las variables clínicas: sexo y antecedentes personales asociados a TDAH y los SNPs significativos mostrados en la Tabla 56, con el objetivo de evaluar el poder predictivo de estas variables en conjunto.

Para el fenotipo de comorbilidad no se obtuvo ningún modelo multivariante cuya precisión fuese de al menos $AUC=0,75$. Se obtuvo el mismo resultado con los modelos hacia delante y hacia detrás, un $AUC=0,593$ (IC95%: 0,530-0,657) (Figura 65).

2.8.3.5. CASO (TDAH) VS CONTROL

Para el análisis multivariante de pacientes de TDAH vs controles sanos se incluyó la variable clínica sexo y los SNPs significativos en el análisis univariante mostrados en la Tabla 57, con el objetivo de evaluar el poder predictivo de estas variables en conjunto.

Para la comparación caso versus control no se obtuvo ningún modelo multivariante cuya precisión fuese de al menos $AUC=0,75$. Para el modelo hacia delante el AUC fue 0,683 (IC95%: 0,643-0,723) y para el modelo hacia detrás el $AUC=0,689$ (IC95%: 0,648-0,729) (Figura 66).

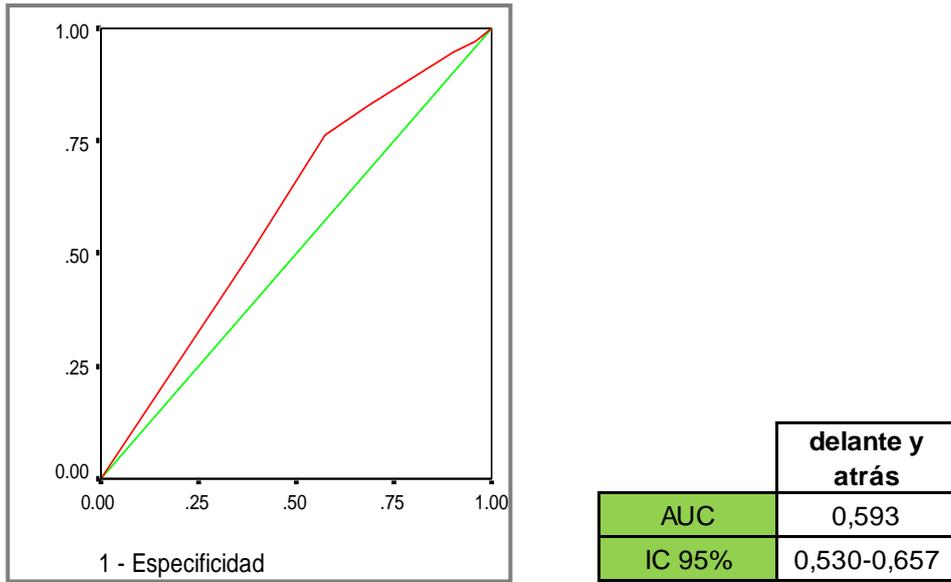
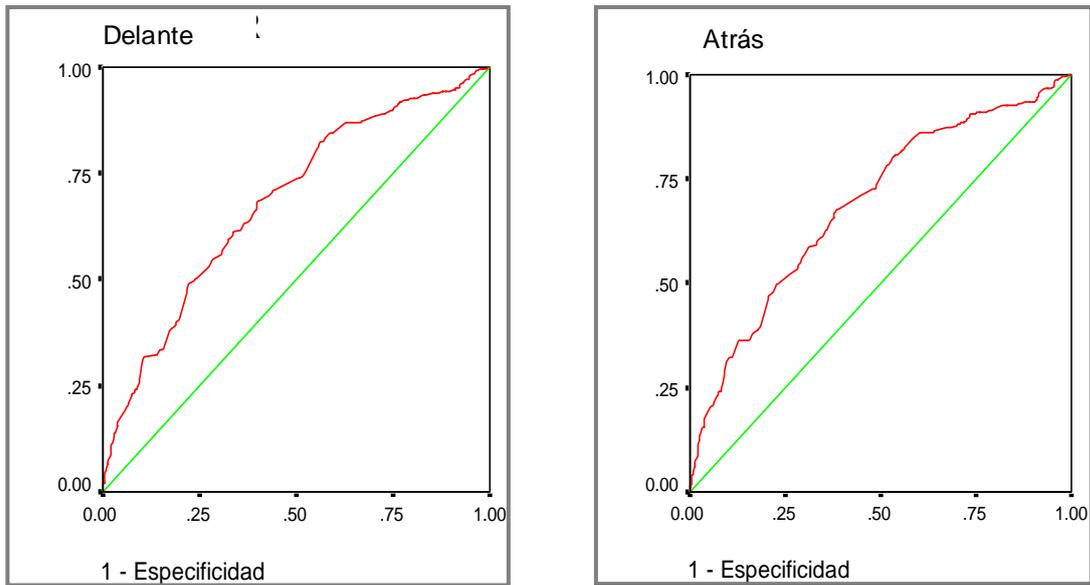


Figura 65.- Imagen de la curva ROC de la probabilidad pronosticada en el modelo hacia delante y hacia atrás de la variable comorbilidad, en el eje de abscisas se representa (1 -especificidad) y en el de ordenadas la sensibilidad. En la tabla se muestran los valores del área bajo la curva (AUC) y el Intervalo de confianza (IC 95%).



| | delante | atrás |
|--------|-------------|-------------|
| AUC | 0,683 | 0,689 |
| IC 95% | 0,643-0,723 | 0,648-0,729 |

Figura 66.- Imagen de la curva ROC de la probabilidad pronosticada en el modelo hacia delante y hacia atrás de la variable caso vs control, en el eje de abscisas se representa (1 -especificidad) y en el de ordenadas la sensibilidad. En la tabla se muestran los valores del área bajo la curva (AUC) y el Intervalo de confianza (IC 95%).

V. DISCUSIÓN

El TDAH es una importante condición psiquiátrica tanto en términos de su prevalencia (en torno al 5% en todo el mundo según datos de la Organización Mundial de la Salud) como de su impacto en la calidad de vida no sólo en los pacientes sino también en sus familias y entorno cercano (Forero et al. 2009). Se trata de un trastorno del comportamiento heterogéneo desde un punto de vista clínico y pronóstico, que tiene su inicio en la infancia pero que evoluciona a lo largo de la vida. Los síntomas característicos del TDAH son hiperactividad, impulsividad e inatención que son los que definen los subtipos actuales, y se encuentran estrechamente relacionados entre sí, siendo lo más frecuente que los sujetos diagnosticados con TDAH los presenten todos en mayor o menor grado, variando además según su edad y grado de desarrollo (Dopheide y Pliszka 2009). Actualmente no existe ninguna herramienta que asegure el diagnóstico de TDAH que hasta la fecha es puramente clínico, ni existe un tratamiento único mediante el que el 100% de los pacientes mejoren su sintomatología. Incluso entre los que responden favorablemente a la medicación existe una gran variabilidad interindividual en la dosis óptima, duración del efecto y tolerabilidad (Stein y McGough 2008). Además, la presencia de trastornos comórbidos, que se estima en torno al 30% de los casos, empeora el pronóstico y es muchas veces más incapacitante que el propio TDAH (Díaz Atienza 2006).

En los últimos años se ha avanzado en el conocimiento sobre las bases biológicas del TDAH en tres líneas fundamentalmente: en la genética, la neurotransmisión y la neuroimagen, campos todos ellos relacionados entre sí. En el área de la neurotransmisión, las vías que principalmente se han asociado con el trastorno son la dopaminérgica, la noradrenérgica y la serotoninérgica, aunque también existen hipótesis alternativas (GABA, resistencia generalizada a la hormona tiroidea, factores ambientales...). Una teoría propuesta recientemente y que podría explicar la gran variabilidad de manifestaciones clínicas existentes en el TDAH sería la hipótesis de múltiples neurotransmisores, según la cual la DA sería el neurotransmisor esencial en el desarrollo del TDAH, pero el resto de neurotransmisores (NA, 5HT, GABA...) actuarían como moduladores clínicos (Himelstein et al. 2000). El campo de la neuroimagen se ha desarrollado especialmente por su importancia en la búsqueda de endofenotipos pero aún queda mucho por hacer en esta área, especialmente en su relación con la genética (Durston 2010). Finalmente, en el campo de la genética, se conoce que el TDAH tiene una de las heredabilidades más elevadas que se han encontrado en trastornos psiquiátricos (en torno al 76%) (Forero et al. 2009), aunque debe mencionarse que también se le atribuye un importante componente ambiental y que las variantes genéticas asociadas hasta el momento sólo explican una pequeña parte del componente genético del TDAH (Stergiakouli y Thapar 2010). Se han realizado más de 200 estudios que han valorado la asociación del TDAH con más de 100 genes diferentes desde que el primer estudio de gen candidato fue completado hace 15 años (Willcutt et al. 2010), incluyendo los estudios de tipo GWAS (*Genome Wide Association Studies*) de reciente aparición. Todos estos estudios se han centrado tradicionalmente en analizar los genes implicados en la neurotransmisión (DA, NA y 5HT especialmente) pero cada vez están ganando más importancia las vías de migración neuronal, adhesión y división celular así como genes implicados en el

metabolismo, siendo todos ellos importantes genes candidatos de asociación con el TDAH y con los fenotipos asociados. Por ello se han incluido representantes de estas vías en el presente estudio. Puesto que se conoce que el TDAH se ajusta a un modelo de herencia multifactorial (Klug et al. 2008), lo que significa que muchos genes, comportándose cada uno de ellos de forma mendeliana, contribuyen al fenotipo de un modo acumulativo, la hipótesis de múltiples neurotransmisores o múltiples vías afectadas parece plausible para explicar la etiopatogenia del trastorno.

Centrándonos en la respuesta al tratamiento, en el área de la farmacogenética se conoce que gran parte de la variabilidad interindividual existente en la tolerancia y respuesta a los tratamientos farmacológicos que se administran para tratar el TDAH es debida a factores genéticos (Stein y McGough 2008; Froehlich et al. 2010), especialmente al metilfenidato (MTF) y a la atomoxetina (ATX) que han sido los más estudiados y en los que nos hemos centrado también en este estudio. Los estudios de farmacogenética del TDAH tradicionalmente se han centrado en los genes de las vías catecolaminérgicas y en la respuesta a MTF. Sin embargo, son muchos los que consideran que los esfuerzos futuros deberían encaminarse a examinar un rango más amplio tanto de fármacos estimulantes como no estimulantes (Stein y McGough 2008) y sería un factor a incluir en futuros análisis de respuesta a tratamiento.

En el desarrollo de este trabajo se han analizado posibles marcadores genéticos relacionados tanto con el diagnóstico de TDAH como con los distintos fenotipos asociados de gran relevancia en la evolución de un paciente desde que es diagnosticado (presencia de comorbilidades, normalización clínica de los síntomas, subtipo de TDAH y severidad) como también con la respuesta al tratamiento farmacológico directamente (MTF y ATX). Todo ello se ha realizado con la intención de proporcionar una herramienta genética que permita ayudar al tratamiento y predecir la evolución de estos pacientes. Éste es probablemente el primer estudio multicéntrico específico en población española que relaciona todos los conceptos descritos en la bibliografía como implicados en la mejoría o no mejoría sintomatológica de los sujetos diagnosticados con TDAH y la posible base genética de los mismos.

A pesar de que los resultados de asociaciones obtenidos son prometedores y útiles para el cálculo de susceptibilidades genéticas, no se ha obtenido ningún modelo multivariante con la sensibilidad y especificidad necesarias para poder clasificar adecuadamente a los pacientes diagnosticados de novo, por lo que sería interesante poder realizar una segunda validación clínica (con un mayor número de muestras) de los polimorfismos asociados con una segunda población de pacientes de TDAH de origen también caucásico no relacionada con la primera para ver si se replican las asociaciones obtenidas. Al mismo tiempo, se podría plantear un estudio prospectivo controlado para evaluar la respuesta a tratamiento farmacológico en función del genotipo, en el que se tengan en cuenta las limitaciones del presente estudio que se describirán a continuación.

1. ELECCIÓN DEL TIPO DE ESTUDIO Y LIMITACIONES ASOCIADAS

En el planteamiento de este trabajo se ha hipotetizado sobre la idea de que describiendo las variantes genéticas asociadas tanto al diagnóstico de TDAH, como a los distintos fenotipos asociados, o a la respuesta a ATX y MTF directamente, se podría personalizar el tratamiento y conseguir una respuesta óptima con los menores efectos secundarios posibles en cada paciente. Para ello se ha realizado un estudio descriptivo de asociación genotipo-fenotipo, observacional y de corte transversal (con recopilación de información de forma retrospectiva). Para su desarrollo se planteó un estudio clínico multicéntrico en población principalmente infanto-juvenil de origen español (población caucásica).

Según la hipótesis de trabajo, la variabilidad presente en la respuesta a tratamiento en los individuos diagnosticados como TDAH se podría estar generando por la existencia de diferentes subgrupos dentro de la enfermedad, con manifestaciones clínicas heterogéneas como son los distintos subtipos de TDAH, la presencia o no de trastornos comórbidos, la mayor severidad de la sintomatología o la normalización clínica o no de la sintomatología tras recibir tratamiento entre otros. Esta heterogeneidad podría sugerir que, dentro del diagnóstico de TDAH, se están incluyendo en la actualidad distintos procesos con mecanismos etiopatogénicos próximos pero diferentes. Por lo que, además del análisis directo de respuesta a MTF y ATX, se decidió abordar esta heterogeneidad desde su posible base genética, suponiendo que, si en realidad son distintos mecanismos etiopatogénicos, éstos podrían estar asociados con distintas variantes genéticas, y por lo tanto podríamos diferenciar subgrupos dentro del TDAH en función de dichas variantes (aunque estas variantes no sean causales de la mencionada sintomatología, si no simplemente asociadas a ella). Un factor que podría estar influyendo en esta heterogeneidad podría ser también el error diagnóstico (Meijer et al. 2009; Richman et al. 2004; Levin 2007; Singh et al. 2006), ya que no existe ningún parámetro físico-químico cuantificable que facilite y asegure dicho diagnóstico y existen numerosas publicaciones que postulan que se está produciendo un sobrediagnóstico del TDAH en la actualidad. Por esta razón, también se ha buscado si existe algún marcador genético o combinación de marcadores que podrían facilitar/confirmar dicho diagnóstico mediante un valor de susceptibilidad a TDAH en la población de estudio. Por lo tanto, la hipótesis que se ha seguido en este trabajo ha sido la de que quizá si determináramos estos factores genéticos (asociados a diagnóstico de TDAH, a respuesta a ATX y MTF y a los distintos fenotipos asociados a TDAH), y fuésemos capaces de diferenciar estas poblaciones dentro del TDAH podríamos ofrecer un tratamiento personalizado a estos pacientes, que sin duda mejoraría su evolución y pronóstico.

La razón de seleccionar un estudio de tipo genético frente a uno de neurotransmisión (biología molecular) o neuroimagen que son las otras dos vías en las que se están realizando importantes avances en la investigación el TDAH, fue clara en nuestro caso. En un análisis genético se pueden estudiar simultáneamente múltiples vías relacionadas con el TDAH (incluso

vías nuevas que nunca han sido asociadas con el trastorno). Además al tratarse de un estudio no invasivo (el ADN fue extraído a partir de muestras de saliva), supone una gran ventaja para llevar a cabo un estudio en población infantil. Finalmente se puede analizar de forma sencilla y económica un número de muestras mucho mayor al que nos permite, por ejemplo, la técnica de neuroimagen. Si bien es cierto que, el hecho de que también los factores biológicos y ambientales tienen efecto en la evolución de un paciente de TDAH podría ser una crítica a los estudios de asociación genética. Por ello, en este estudio se pretendió integrar las variables clínicas más comúnmente implicadas en la evolución de los pacientes en los modelos de regresión multivariante para tener un modelo que integrara tanto variables clínicas como polimorfismos genéticos. Sin embargo, la baja sensibilidad y especificidad de los modelos obtenidos no lo hizo posible. Por ello, y como ha sido validado previamente en la bibliografía, se describirán susceptibilidades genéticas para cada una de las variables de estudio, de la forma en la que se ha descrito en el apartado de resultados.

La elección de un estudio de corte transversal con búsqueda de información de forma retrospectiva vino determinada fundamentalmente por el hecho de que son estudios mucho más rápidos que los prospectivos y económicamente más asequibles. Este tipo de estudios son muy frecuentes y útiles en el campo de la farmacogenética en general y de la farmacogenética de enfermedades psiquiátricas en particular (Ferreira et al. 2009; Kim et al. 2009a) por las ventajas anteriormente mencionadas. Asimismo, si el planteamiento de este tipo de estudios es el adecuado, se plantean las preguntas correctas y se conocen sus limitaciones, la información que pueden ofrecer puede ser tan relevante como la de los estudios prospectivos, ya que además en nuestro caso, el factor de riesgo que se evalúa al ser un polimorfismo genético, se mantiene estable a lo largo del tiempo (Blanc et al. 2010; He y Allen 2010). Sin embargo, una de las limitaciones que presenta un estudio retrospectivo de respuesta a tratamiento como el que se ha realizado en este trabajo, es que no existen pacientes "naive" (pacientes que no han recibido tratamiento) para realizar las comparaciones, ya que no sería una práctica ética no tratar a un niño con TDAH. Además, dada la dificultad de obtener pacientes que cumplieran los criterios de inclusión y cuyo tratamiento hubiera estado controlado en el tiempo, los tratamientos que han recibido los pacientes participantes en el estudio no han sido controlados y son muy diversos (siendo MTF y ATX los principales, pueden ser el único tratamiento, estar combinados entre ellos o con un tercer fármaco de una amplia gama de tratamientos), las dosis recibidas son desiguales y durante diferentes periodos de tiempo, no se conoce la adherencia real al tratamiento y en el caso de que se les haya cambiado el tratamiento desconocemos si fue por falta de eficacia o por aparición de efectos secundarios. Por todo ello, se hace muy difícil normalizar toda esta información para poder hacer un análisis estadístico de respuesta a tratamiento fiable y eliminar sesgos. Incluso se producen mayores valores perdidos y pérdida de información clínica relevante debido simplemente al paso del tiempo. Un posible mejor planteamiento de un estudio comparativo es el que describen Solanto y colaboradores, fácilmente aplicable a un estudio genético, donde realizan un análisis doble ciego con distintas

dosis entre pacientes del subtipo inatento y combinado bien caracterizados y con sintomatología basal equiparable y comparan la mejoría evaluándola desde distintos puntos de vista (Solanto et al. 2009).

Finalmente, se decidió que se tratara de un estudio multicéntrico español para intentar obtener una población de individuos diagnosticados como TDAH lo más representativa posible de la población real de TDAHs española y minimizar posibles sesgos diagnósticos. Se trató de obtener la heterogeneidad más cercana a la real presente en la población de pacientes de TDAH, pero se establecieron criterios diagnósticos estrictos para asegurar que la población de estudio incluía solamente a pacientes de TDAH y no estuviera contaminada con otros trastornos. Al menos, de acuerdo con lo que actualmente está descrito en el manual DSM-IV-TR como TDAH, aun sabiendo que estos criterios van a ser revisados en la próxima edición, en el DSM-V. Por lo tanto, la selección de sujetos para el estudio y el establecimiento de criterios de inclusión fue un factor determinante del estudio al que se dedicó mucho tiempo y fue establecido en consenso conjuntamente con los investigadores clínicos. Aun tratándose de un estudio retrospectivo, la recolección de muestras fue un proceso largo y tedioso en el que hubo que coordinar a los 14 centros colaboradores y revisar detalladamente que todos los pacientes cumplieran los criterios de inclusión realizando numerosas monitorizaciones clínicas.

El estudio de asociación genotipo-fenotipo se planteó en dos etapas fundamentales que ya han sido descritas previamente. El estudio piloto en el que se seleccionó una herramienta de genotipado económica y flexible para el análisis de los SNPs más relevantes descritos en la bibliografía por su asociación con el TDAH y en un número de muestras relativamente pequeño para valorar la posible carga genética en el pronóstico y respuesta a tratamiento del TDAH. En el posterior estudio completo de asociación se incluyó además el estudio diagnóstico, el número de polimorfismos y muestras analizadas fue mucho mayor (216 SNPs, 4 reordenamientos genómicos y VNTRs y 799 muestras) y se incluyó el genotipado del CYP2D6 para analizar la respuesta a ATX, para lo que se recurrió a las técnicas de alta capacidad de genotipado. No deberían compararse los resultados de asociación obtenidos entre ambos estudios, ya que los resultados del estudio piloto deberían ser interpretados como orientativos de la carga genética de los fenotipos analizados, pero no como concluyentes de asociación, ya que el tamaño muestral del estudio fue muy inferior a la del estudio completo de asociación (274 vs 799).

Con todos los medios descritos, se planteó como objetivo dar respuesta a lo largo del estudio a las siguientes preguntas:

- 1) ¿Existe una asociación entre ciertos polimorfismos genéticos y un mayor riesgo de padecer TDAH? Sí, al menos en la población de estudio parece existir tal relación. Se encontraron 11 SNPs y una inserción de 120 bp asociados de forma estadísticamente significativa al comparar a la población de TDAH frente a la población control.

- 2) ¿Existe una asociación entre ciertos polimorfismos genéticos y determinados fenotipos asociados a TDAH que influyen en la diferente evolución de los pacientes? Sí existe asociación en la población de estudio, con la normalización clínica de los síntomas, con la severidad, con el subtipo y con la presencia/ausencia de comorbilidades.
- 3) ¿Existe una asociación entre ciertos polimorfismos genéticos y la respuesta al tratamiento farmacológico que se aplica actualmente en el TDAH? No se ha encontrado ninguna asociación estadísticamente significativa entre los polimorfismos analizados ni con la respuesta a ATX ni con MTF. Esta ausencia de asociación podría deberse al pequeño tamaño muestral analizado en el caso de la atomoxetina o a las limitaciones propias del estudio (desconocimiento de dosis, adherencia al tratamiento...) en el caso de ambos fármacos.
- 4) ¿Se podrían utilizar estas asociaciones genéticas junto con las características clínicas para elaborar un modelo de regresión que sea capaz de clasificar adecuadamente a los pacientes para poder confirmar el diagnóstico y tratarles de forma personalizada? ¿Se podría desarrollar una herramienta de genotipado para ello? En la población analizada no fue posible el desarrollo de ningún modelo de regresión capaz de clasificar adecuadamente a los pacientes en función de su perfil genético y de las características clínicas con la sensibilidad adecuada. Sin embargo, se podrían determinar susceptibilidades genéticas a TDAH y a cada uno de los fenotipos asociados y para ello se podría desarrollar una herramienta de genotipado, actualizando con las asociaciones obtenidas el actual chip de genotipado que se ha utilizado en el estudio piloto.

2. ESTUDIO PILOTO: DISEÑO Y DESARROLLO DE UN CHIP DE GENOTIPADO

El estudio piloto resultó fundamental a la hora de la correcta consecución de este estudio ya que permitió explorar de una forma económica la viabilidad del estudio completo, además de la posibilidad de diseñar una potencial herramienta de genotipado de posible aplicación comercial para el diagnóstico, pronóstico y respuesta a tratamiento del TDAH. Este análisis preliminar se planteó como el desarrollo de un chip de genotipado en el que se incluyeron 87 SNPs que se seleccionaron tras una primera búsqueda bibliográfica y se analizaron 274 muestras de pacientes de TDAH, número de muestras que se consideraron suficientes para determinar si existían asociaciones significativas entre genotipo y fenotipo. El período de tiempo aproximado para este estudio fue de dos años desde que se inició la búsqueda bibliográfica hasta obtener los resultados de asociación. De esta forma, además de los resultados obtenidos, se disponía de una potencial herramienta de genotipado de aplicación comercial en el área del TDAH. Esto sería posible tras actualizar el chip con los polimorfismos de interés sugidos del estudio completo. También sería de gran relevancia poder realizar una segunda validación clínica de la herramienta con una población independiente.

Gracias a los resultados positivos de asociación obtenidos en el estudio piloto mediante el desarrollo del chip de genotipado, se continuó con el proyecto y se realizó el esfuerzo y la inversión necesaria para genotipar los 216 SNPs en la totalidad de las muestras recogidas (799; 399 muestras de pacientes de TDAH y 400 muestras de controles) además de las inserciones, deleciones, VNTRs y genotipado del CYP2D6.

Con estos resultados se demuestra también la utilidad de los DNACHIPS de genotipado para la detección de SNPs y su aplicación en estudios de asociación genotipo-fenotipo en enfermedades psiquiátricas y en el TDAH en particular, aunque su aplicación en otro tipo de trastornos está ya justificada (Tejedor et al. 2005). Además queda patente la gran versatilidad de estas herramientas de genotipado, ya que el chip queda abierto a la inclusión/exclusión de los polimorfismos que se consideren adecuados tras realizar el estudio completo de asociación. Por otro lado, en el caso de grandes cantidades de polimorfismos y muestras a genotipar se recurrirá a las técnicas de alta capacidad de genotipado.

3. ESTUDIO COMPLETO DE ASOCIACIÓN

A continuación se van a detallar los fenotipos analizados en cada caso, los resultados obtenidos, la razón de su importancia en la determinación del tratamiento más adecuado y su relación con los estudios publicados en la bibliografía hasta el momento. En la Tabla 75 que aparece al final de este capítulo, se muestra un resumen de los genes en los que se ha encontrado asociación estadísticamente significativa con cada una de las variables de estudio, agrupados según las funciones biológicas y las vías en las que intervienen.

3.1. DIAGNÓSTICO: TDAH VS CONTROL

El primer paso que se debería resolver antes de poder decidir acerca del tratamiento farmacológico más adecuado para un paciente sería el de confirmar el diagnóstico de TDAH. En la actualidad, como se ha comentado en el apartado de Introducción, no existe ningún parámetro físico-químico cuantificable que pueda ser utilizado para apoyar el diagnóstico de TDAH, diagnóstico que es puramente clínico, a pesar de que muchos han sido los intentos para buscar dicho parámetro. Por ejemplo, el grado de maduración cortical se ha propuesto como posible prueba diagnóstica (Fernandez et al. 2009; Shaw et al. 2007a; Aitchison y Galitski 2003; Almeida et al. 2010) pero por el momento no se plantea para la publicación del DSM-V incluir pruebas neurológicas para complementar el diagnóstico de TDAH, ya que se considera que podría existir un gran margen de error. No hay suficiente evidencia de que la sensibilidad de estas pruebas sea adecuada para el uso clínico en el caso del TDAH.

En la comparación de la población de pacientes de TDAH (n=355) versus la población de controles sanos (n=399) de los 194 SNPs y 4 reordenamientos genotipados y filtrados, se obtuvieron 18 asociaciones estadísticamente significativas en el test de alelos (Tabla 57), 12 de las cuales se confirmaron en el test de genotipos. La obtención de asociaciones estadísticamente significativas en genes implicados en diferentes vías de neurotransmisión (dopaminérgica, adrenérgica y serotoninérgica), vías metabólicas (detoxificación SNC y metabolismo de aminas neuractivas) y otras como la adhesión celular, estaría apoyando la hipótesis multifactorial del trastorno, que postula que muchos genes, comportándose cada uno de ellos de forma mendeliana, contribuyen al fenotipo de un modo acumulativo (Klug et al. 2008). Esta teoría está cada vez ganando más fuerza gracias en parte a los estudios de tipo GWAS, cuyos resultados sugieren que no existen genes de susceptibilidad con efectos grandes o moderados, sino que cada vez más se implican a variantes poco comunes (variantes "raras") en el refinamiento de los distintos fenotipos de TDAH. Pero incluso si estas variantes de riesgo de TDAH tienen efectos muy pequeños, como se cree, pueden poseer gran relevancia clínica, ya que la heredabilidad del TDAH, que aun falta por explicar puede ser debida a estas variantes en pacientes individuales y porque conociendo mejor sus funciones y las vías en las que están implicadas se podría llegar a

mejorar los métodos diagnósticos y a enfocar las estrategias farmacológicas hacia esas potenciales dianas (Stergiakouli y Thapar 2010).

A continuación se van a comentar de forma más detallada cada uno de los genes que mostraron asociación estadísticamente significativa en ambos tests por su posible aplicación en un test de aplicación comercial de confirmación de diagnóstico genético de TDAH, así como se va a comentar el significado biológico de cada una de estas asociaciones.

La proteína codificada por el gen de la monoaminoxidasa tipo B (MAOB) pertenece a la familia de las flavin monoamino oxidasas. Se trata de una enzima localizada en la membrana mitocondrial que se encarga de catalizar la desaminación oxidativa de compuestos aminados. Este proceso es clave en el metabolismo de las aminas neuroactivas, como la DA, principal neurotransmisor asociado con la fisiopatología del TDAH. Existen evidencias previas además de la implicación del gen MAOB en la etiología del TDAH (Ribases et al. 2007). Un reciente estudio realizado en población española con 451 pacientes TDAH y 400 controles ha demostrado que los adultos portadores del haplotipo C-G-C para los SNPs rs3027415, rs5906213 y rs5905512 tienen un riesgo incrementado (OR=1,90; $p = 0,0052$) de sufrir TDAH (Ribases et al. 2009b). En concordancia con estos resultados, el presente estudio indica que el alelo de menor frecuencia G de dos SNPs (rs1799836, rs5906213) localizados en el gen MAOB conferirían un riesgo incrementado de TDAH (OR=1,56; $p < 0,001$ y OR=1,45; $p < 0,001$, respectivamente) en población caucásica española.

El gen HTR1B codifica el receptor 1B de la serotonina (5HT_{1B}). La 5HT es un neurotransmisor con múltiples efectos, involucrado en enfermedades neuropsiquiátricas en general y en el TDAH en particular (hipótesis serotoninérgica). Sus receptores, como el HTR1B, se localizan en el sistema nervioso y transmiten las señales a segundos mensajeros intracelulares. La región cromosómica en la que se localiza el gen HTR1B se identificó originalmente como locus de riesgo de TDAH en un estudio multicéntrico con 273 familias (Hawi et al. 2002) y posteriormente se ha replicado en distintas poblaciones. Un metaanálisis publicado recientemente (Gizer et al. 2009) y que integra datos de 9 estudios previos, ha establecido que los portadores del alelo G del SNP rs6296 del gen HTR1B presentan un riesgo incrementado de TDAH (OR=1,11; $p = 0,01$). En el presente estudio, se confirma este resultado ya que el alelo G se asocia con un riesgo incrementado de sufrir TDAH (OR=1,43; $p < 0,01$).

El locus hCG_1818231 se localiza en la región cromosómica 10q22.1 y codifica la proteína hipotética LOC729187. Su función es aún desconocida pero se conoce que en la región cromosómica 10q se han identificado previamente varios loci de riesgo de TDAH mediante estudios de asociación (Loo et al. 2004), e incluso estudios funcionales (Tranham-Davidson et al. 2008). En nuestro estudio los portadores del alelo C del SNP localizado en este locus

presentan un riesgo incrementado de TDAH (OR=1,36; $p < 0,01$), lo que parece confirmar los resultados anteriores y deja la puerta abierta a nuevas investigaciones en esta región.

El gen ADRB2 codifica el receptor adrenérgico β_2 , un receptor de membrana, acoplado a proteína G. Se han identificado SNPs en el gen ADRB2 asociados con el TDAH (Brookes et al. 2006b), resultados que han sido replicados posteriormente (Lasky-Su et al. 2008a). En nuestro estudio el alelo C del SNP rs1042718 localizado en el gen ADRB2 se asocia con un riesgo incrementado de TDAH (OR=1,47; $p=0,001$), confirmando de este modo la implicación del gen ADRB2 con el TDAH.

La proteína codificada por el gen TPH2 se corresponde con la enzima triptófano hidroxilasa. Esta enzima que cataliza el primer paso, siendo éste limitante, de la biosíntesis de 5HT. La 5HT es una potente hormona y un neurotransmisor asociado a numerosos trastornos psiquiátricos, neurológicos y afectivos, como se ha comentado anteriormente. En el año 2005 se estableció la primera asociación entre un SNP del gen TPH2 (rs1843809) y el TDAH, además de con numerosos haplotipos (Sheehan et al. 2005). Posteriormente, otros GWAS han confirmado la asociación de este gen con el TDAH (Lasky-Su et al. 2008b). Según nuestros resultados, el alelo G del SNP rs4565946 del gen TPH2 confiere un riesgo incrementado de padecer TDAH (OR=1,33; $p < 0,01$). Este SNP podría encontrarse en LD con los previamente descritos en la bibliografía como asociados a TDAH. Además, se ha implicado también en el riesgo incrementado de padecer otros trastornos psiquiátricos como son la depresión de inicio tardío y el trastorno obsesivo-compulsivo (Pereira et al. 2011; Rocha et al. 2011).

El SNP con código rs478597 se sitúa en la región del gen NOS1 que codifica la sintasa de óxido nítrico (NO) neuronal. La NOS1 se encarga de sintetizar el óxido nítrico, un radical libre reactivo que actúa como mediador en diferentes procesos como la neurotransmisión. Estudios previos han asociado determinadas variantes alélicas en el promotor del gen NOS1 con la aparición de comportamientos impulsivos como el TDAH (Reif 2010). En concreto, el SNP rs478597 se ha visto significativamente asociado al fenotipo de falta de atención en un GWAS con 502 familias de sujetos afectados de TDAH (Lasky-Su et al. 2008b). En este estudio con población caucásica española, el alelo G del SNP rs478597 se asocia con mayor probabilidad de TDAH (OR=1,33; $p=0,01$). Sin embargo no se ha encontrado la asociación descrita en la bibliografía con el subtipo TDAH inatento (inatento vs hiperactivo-impulsivo+combinado), ($p=0,75$) como se muestra en los resultados de asociación del subtipo de TDAH.

El gen NEUROD6 genera un neurotransmisor de la familia NEUROD de diferenciación neurogénica. Se ha reportado bibliográficamente que en sujetos con TDAH existen asimetrías entre los dos hemisferios cerebrales (Shaw et al. 2009). Un estudio realizado con sujetos TDAH españoles reveló que la expresión del gen NEUROD6 difería más de dos veces entre los hemisferios de estos pacientes (Ribases et al. 2009a). En el presente estudio, el alelo A del SNP

rs2233404 localizado en el intrón 1 y el alelo A del SNP rs10238918 localizado en la región 3'UTR confieren mayor riesgo de TDAH ($p=0,02$ y $0,03$ respectivamente), lo que podría estar relacionado con la diferente expresión. La asociación del SNP rs2233404 parece más fuerte que la de las restantes, ya que se confirma también en el caso del test de genotipos.

La proteína carboxil esterasa 1 está codificada por el gen CES1 y participa en la hidrólisis de ésteres aromáticos y alifáticos, como por ejemplo, drogas que contienen enlaces ester y amida, como la cocaína y la heroína o fármacos para el tratamiento del TDAH como el MTF. Su función parece ser la de proteger al SNC mediante la detoxificación en el hígado de este tipo de compuestos. Los portadores del alelo menor del SNP rs71647871 (A; Glu143) presentan una actividad catalítica reducida hasta un 21% de la actividad normal (Zhu et al. 2008) y en consecuencia, los portadores del alelo mayor (C; 143Gly) requieren mayores dosis de MTF para conseguir efecto terapéutico (Nemoda et al. 2009). En nuestro estudio el alelo mayor C se asocia con mayor riesgo de TDAH (OR=3,42; $p = 0,02$) pero no muestra asociación con la variabilidad en la respuesta a MTF.

El SNP rs11594082 se localiza en la región del gen CDH23, que codifica la cadherina 23. CDH23 es una proteína de adhesión celular, dependiente de calcio, que se expresa en el epitelio neurosensorial. Se han asociado defectos en esta proteína con la interrupción de las señales nerviosas que viajan al cerebro y con algunos síndromes sensoriales. El alelo C del SNP rs11594082 se ha asociado al riesgo de TDAH en un GWAS realizado con 343 pacientes de origen alemán y 250 controles (Lesch et al. 2008). En nuestro estudio se confirma la asociación de dicho alelo con un mayor riesgo de TDAH (OR=1,47; $p = 0,02$).

A pesar de que la función de la proteína C10ORF79 es desconocida, se sabe que el gen que la codifica se localiza en la región 10q25 y como ya se ha discutido anteriormente, la región cromosómica 10q parece ser un locus de riesgo de TDAH, tal y como describen estudios de asociación y estudios funcionales previos (Loo et al. 2004b, Trantham-Davidson et al. 2008a). Al igual que el SNP en el gen CDH23, el SNP rs515910 localizado en el gen C10orf79 también, se ha asociado al riesgo de TDAH en el GWAS alemán citado anteriormente (Lesch et al. 2008). En nuestro estudio se confirmaría dicha asociación, confirmando el alelo G un mayor riesgo de TDAH (OR=1,24; $p=0,04$).

La inserción de 120 pb se localiza 1,2 kb localizada hacia el extremo 5' del codón de iniciación de transcripción del gen DRD4, que codifica el receptor de dopamina D4, siendo la dopamina el neurotransmisor asociado con el TDAH por excelencia. El alelo ins120 se ha asociado previamente con un mayor riesgo de TDAH (McCracken et al. 2000; Loo et al. 2004). Mientras que la evidencia experimental indica una mayor capacidad de unión del factor de transcripción Sp1 cuando la inserción de 120 pb está presente (Ronai et al. 2004; Loo et al. 2004), lo que influiría sobre la transcripción a ARN mensajero. Nuestro estudio coincide con las

asociaciones descritas, ya que el alelo ins120 confiere un mayor riesgo de TDAH (OR=2,12; p=0,049) en población caucásica española.

Los motivos por los que el resto de polimorfismos que, aun estando previamente descritos como asociados a un mayor riesgo de padecer TDAH (pertenecientes a genes como DAT1, SNAP25, COMT, DDC...), no se han replicado en este estudio con la población descrita en las asociaciones univariantes, podría deberse a diversos factores, principalmente tres:

- a) Al tipo de población de estudio. En nuestro caso se trata de población caucásica española, en su mayoría niños, mientras que en los artículos a partir de los que se han seleccionado los polimorfismos relevantes se estudian poblaciones de muy distinto origen étnico y puede que al no tratarse necesariamente de polimorfismos asociados directamente con el trastorno (puede ser que esté asociado porque el polimorfismo se encuentre en desequilibrio de ligamiento con el verdadero implicado en la fisiopatología del TDAH) las asociaciones sean distintas entre distintas etnias.
- b) Al tamaño poblacional. Quizá en algunos casos se analizaron poblaciones pequeñas y la conclusión de asociación fue producida en realidad por un sesgo. O en nuestro caso (n=754) puede que no exista el suficiente poder estadístico para ver asociaciones pequeñas.
- c) A la heterogeneidad de la población de estudio, ya que se trata de un factor importante que puede limitar el poder estadístico del análisis.

En cualquier caso, es común que en estudios con distintas poblaciones no se repliquen los resultados de asociación obtenidos previamente debido a diferencias genéticas poblacionales (sobre todo en estudios de asociación no causales) y por ello es esencial realizar estas replicaciones.

Posteriormente, en el análisis multivariante no se obtuvo ningún modelo con un valor predictivo suficiente, pero esto no quiere decir que la información obtenida no pueda ayudar a confirmar el diagnóstico, ya que se pueden utilizar las asociaciones individuales para calcular un “riesgo relativo de susceptibilidad a TDAH” de la forma que se muestra en la Tabla 69 para su posible aplicación en clínica. En este “test diagnóstico” potencial se incluirían solamente los SNPs que mostraron asociación significativa tanto en el test de alelos como en el de genotipos y que se han descrito previamente. Se multiplicaría el OR (obtenido en el análisis de asociación) de cada genotipo de riesgo que porte el individuo de estudio y eso conferiría su riesgo relativo a TDAH, siempre dejando la interpretación global del resultado en manos de un clínico experto. Este tipo de cálculo de susceptibilidades relativas multiplicando el OR que aporta cada polimorfismo está validado en la bibliografía (De Jager et al. 2009; Willcutt et al. 2010). El riesgo

relativo indicaría la probabilidad aumentada de un individuo portador de los alelos de riesgo frente a un no portador de estos alelos. Siendo el máximo riesgo el producto de los ORs si todos los alelos de riesgo estuvieran presentes en homocigosis, una posible representación gráfica de este resultado se muestra en la Figura 67, donde el mínimo riesgo es 0 si no se posee ninguno de los alelos de riesgo y 1 el máximo riesgo si se es homocigoto para todos ellos.

Tabla 69.- Tabla que muestra cómo se calcularía la susceptibilidad genética relativa a TDAH de un individuo con TDAH participante en el estudio, según los resultados que se han obtenido en el análisis multicéntrico nacional con 399 muestras de pacientes de TDAH y 400 muestras control. Se indica el código rs de cada SNP o la descripción del reordenamiento en el caso de la inserción de DRD4, el gen al que pertenecen, el alelo de riesgo o si es de protección se marca con un asterisco, el valor OR 0 (para el genotipo homocigoto para el alelo no de riesgo), OR 1 (genotipo heterocigoto) y OR 2 (genotipo homocigoto para el alelo de riesgo) y el resultado de genotipado para el individuo. Solamente se han incluido aquellos SNPs significativos tanto en el test de alelos como en el de genotipos y los valores de OR se han obtenido del modelo de herencia más parsimonioso en cada caso como se indica: codominante, dominante, recesivo y aditivo. El máximo riesgo se calcula multiplicando los OR 2 (que el individuo posea todos los alelos de riesgo en homocigosis es el riesgo máximo). Para el SNP rs71647871 y la ins120pb de DRD4 no se ha podido calcular el OR2 porque no se disponía de muestras con genotipo homocigoto para el alelo de riesgo, en estos casos para el cálculo del riesgo máximo se utiliza el OR1.

| Código rs | Gen | Alelo riesgo | Modelo herencia | OR 0 | OR 1 | OR 2 | Resultado |
|----------------------------------|-----------------|--------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------------|
| rs1799836 | MAOB | G | Recesivo | 1,00 | 1,00 | 1,74 | G/G |
| rs5906213 | MAOB | G | Aditivo | 1,00 | 1,25 | 2,5 | G/G |
| rs6296 | HTR1B | G | Codominante | 1,00 | 1,56 | 1,96 | G/G |
| rs16928529 | hCG_181823 1 | C | Codominante | 1,00 | 1,27 | 2,03 | C/C |
| rs1042718 | ADRB2 | C | Codominante | 1,00 | 1,23 | 6,49 | C/C |
| rs4565946 | TPH2 | G | Recesivo | 1,00 | 1,00 | 1,66 | A/A |
| rs478597 | NOS1 | G | Dominante | 1,00 | 2,27 | 2,27 | G/A |
| rs2233404 | NEUROD6 | A | Recesivo | 1,00 | 1,00 | 1,56 | G/A |
| rs71647871 | CES1 | C | – | 1,00 | 3,45 | – | C/A |
| rs11594082 | CDH23 | C | Dominante | 1,00 | 8,33 | 8,33 | C/C |
| rs515910 | C10orf79 | G | Recesivo | 1,00 | 1,72 | 1,72 | A/G |
| Ins 120pb | DRD4 | ins120 | – | 1,00 | 2,02 | – | ins120-het |
| Riesgo individuo | | | | | | | 65931 |
| Máximo riesgo | | | | | | | 25460 |
| Riesgo relativo individuo | | | | | | | 0,4 |

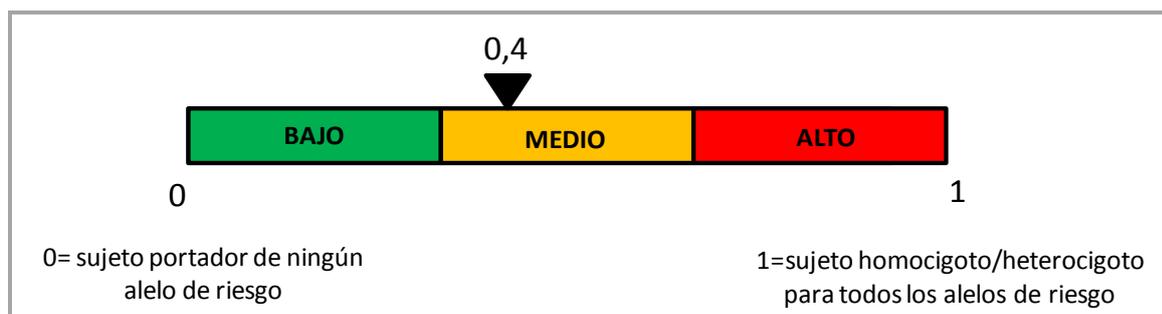


Figura 67.- Representación gráfica del riesgo relativo obtenido para el individuo que se describe en la Tabla 69. Este individuo mostraría un riesgo relativo medio a TDAH.

Es importante tener en cuenta que los criterios diagnósticos que se han utilizado en este estudio son los que se describen en el manual DSM-IV-TR, pero que estos criterios van a sufrir modificaciones con la publicación de la nueva versión DSM-V, por lo que quizá sería interesante repetir los análisis realizados una vez que los criterios sean actualizados y establecidos definitivamente. Esto mismo sucedería también con el análisis del fenotipo subtipo y quizá habría que revisar todos los pacientes incluidos por si alguno de ellos con los nuevos criterios ya no cumpliera diagnóstico de TDAH.

3.2. FENOTIPOS ASOCIADOS A TDAH

En este apartado se ha agrupado la discusión de los resultados correspondientes a las variables de estudio que no muestran una asociación directa con la respuesta a MTF o ATX, pero que podrían ayudar a la elección del tratamiento óptimo ya que podrían servir para subdividir a la población de TDAH en distintos grupos con características y evolución diferentes. Estas variables como se ha descrito anteriormente, son; Normalización clínica de los síntomas, subtipo de TDAH, severidad y presencia/ausencia de comorbilidades.

3.2.1. NORMALIZACIÓN CLÍNICA DE LOS SÍNTOMAS

La primera variable de este tipo que se ha analizado es la normalización clínica de los síntomas tras al menos dos años de evolución desde el diagnóstico, que además es la que se ha utilizado para calificar posteriormente la buena y mala respuesta a tratamiento farmacológico, por lo que es de especial interés. La normalización (60% de los pacientes del estudio) o no normalización clínica de los síntomas (40% de los pacientes genotipados) está indicando cómo evoluciona un paciente desde el momento del diagnóstico y se podría considerar indirectamente como el éxito o fracaso del tratamiento (tanto farmacológico como emocional y psicopedagógico), siempre teniendo en cuenta que también dependerá de otras variables como la presencia/ausencia de comorbilidades, el sexo, la severidad de la sintomatología y el subtipo de TDAH, como se ha comprobado, al menos en la población de estudio. Como describen Stergiakouli y Thapar en su revisión, no sólo el origen del TDAH es genético, si no que la mayoría de la continuidad de los síntomas de TDAH, o dicho de otra forma, la mayoría de la

persistencia de TDAH en el tiempo se atribuye a factores genéticos (Stergiakouli y Thapar 2010). Nuestro estudio apoyaría esta hipótesis. En el análisis univariante de asociación genotipo-fenotipo se obtuvieron asociaciones significativas en el test de alelos para 8 SNPs de los cuales, 6 de ellos mostraron también asociación en el test de genotipos, localizados en 5 genes, pertenecientes a las vías de señalización principalmente dopaminérgica, pero también serotoninérgica y adrenérgica (los genes ADRA1A, SLC6A3 y SLC6A4) y la proteína de 25 kDa asociada al sinaptosoma (SNAP25), como se muestra en la Tabla 52.

El gen SLC6A3/DAT1 codifica para el miembro 3 de la familia 6 de transportadores de DA dependientes de sodio y cloro en la membrana presináptica y es uno de los genes más estudiados por su posible relación con el TDAH. Como se ha comentado anteriormente (Banaschewski et al. 2010; Mill et al. 2005; Daly et al. 1999; Kim et al. 2005; Althaus et al. 2010), se encarga de la recaptación de DA. La variante alélica C del SNP rs27072 que se localiza en la región 3'UTR del gen, se ha asociado a un riesgo incrementado de hiperactividad, impulsividad y déficit de atención, en un estudio realizado con gemelos (Ouellet-Morin et al. 2008). En concordancia, el alelo C del SNP rs27072 confiere en nuestro estudio un riesgo incrementado de no normalización clínica de los síntomas tras al menos dos años de seguimiento (OR=1,75; p=0,01), al igual que el alelo A del SNP rs250686 (OR=1.63; p<0,01), y que el alelo G del SNP rs10040882 (OR=1,89; p<0,001). A pesar de que en el estudio diagnóstico no se ha encontrado asociación entre estos SNPs y un mayor riesgo de TDAH, parece un importante marcador genético en la normalización clínica de los síntomas.

Otro miembro de esta familia de proteínas, es el transportador de 5HT o SLC6A4, que se encarga de reciclar el neurotransmisor 5HT desde el espacio sináptico a la neurona presináptica. El SLC6A4 es diana de psicoestimulantes como la cocaína o antidepresivos y ha sido identificado como un **QTL** (*Quantitative Trait Locus*) de riesgo para TDAH (Curran et al. 2005). Un polimorfismo de repetición en la región promotora de este gen se ha asociado a comportamientos agresivos y depresión. El alelo C del SNP rs1042173 localizado en el 3' UTR del gen, se ha asociado a mayor expresión del transportador de serotonina (Seneviratne et al. 2009) posiblemente debido a un aumento de la estabilidad del ARNm, ya que el SNP se localiza en un sitio de poliadenilación (Curran et al. 2005; Seneviratne et al. 2009). En nuestro estudio, el alelo C del SNP rs1042173 se asocia con un mayor riesgo de no normalización clínica en enfermos con TDAH (OR=1,45; p=0,01).

El gen ADRA1A codifica el receptor adrenérgico α 1A acoplado a proteína G, que participa en la transmisión de señales nerviosas mitogénicas y la regulación del crecimiento y la proliferación celular. Un GWAS realizado con familias con TDAH encontró una asociación significativa entre todos los síntomas de la enfermedad estudiados (síntomas impulsivos-hiperactivos y síntomas de falta de atención) y varios SNPs en el gen ADRA1A (Lasky-Su et al. 2008b). En otro estudio reciente con 270 familias afectadas de TDAH, se analizaron 557 SNPs

en 27 genes candidatos y la señal de asociación más intensa correspondió al SNP rs3808585 en el gen ADRA1A (Elia et al. 2009a). En concordancia con estos resultados, en nuestro estudio el alelo G de este SNP confiere un riesgo incrementado de no normalización clínica de los síntomas tras al menos dos años de evolución ($p=0,03$, $OR=1,62$) por lo que la asociación de este gen con el TDAH, aunque de descubrimiento reciente parece de gran interés.

El gen SNAP25 codifica la proteína de 25 kDa asociada al sinaptosoma, una proteína específica neuronal implicada en la exocitosis catecolaminérgica, participando en el anclaje de vesículas y fusión de membranas. En nuestro estudio, el alelo G del SNP rs3787283 se asocia con mayor riesgo de no normalización clínica de los síntomas. Este SNP está en fuerte LD con otros dos (rs3746544 y rs1051312) que han sido previamente asociados con TDAH (Kim et al. 2007). Además este SNP en concreto en el estudio llevado a cabo por Kim y colaboradores se asocia con la presencia de depresión mayor como trastorno comórbido al TDAH (Kim et al. 2007), lo que podría estar relacionado con la no normalización de la sintomatología. Este SNP también se ha asociado con la esquizofrenia (al igual que el rs3746544), pero en este caso el alelo asociado fue el A (Carrol et al. 2009).

El resto de polimorfismos no ha mostrado asociación estadísticamente significativa con la normalización clínica de los síntomas tras al menos dos años de seguimiento clínico después del diagnóstico. Este hecho no es de extrañar ya que en la bibliografía consultada no había referencias de asociación de los polimorfismos genotipados con esta variable, siendo éste el primer análisis de este tipo. Por ello también sería interesante confirmar los resultados en una población independiente.

En el análisis de asociación de las variables clínicas entre sí, la Normalización clínica de la sintomatología asociada a TDAH tras al menos dos años de evolución es la que más asociaciones ha mostrado con el resto de variables clínicas, como son el sexo, la severidad de la sintomatología asociada a TDAH evaluada según la escala ICG, la presencia de comorbilidades y el subtipo de TDAH. Por ello, parece guardar una estrecha relación con estas variables. A pesar de esto, los modelos multivariantes (SNPs y variables clínicas) desarrollados no mostraron una precisión suficiente ($AUC < 0,75$). Sin embargo, del mismo modo que se ha explicado para la aplicación diagnóstica (TDAH vs control), se podría elaborar un informe en base a la susceptibilidad genética de un individuo a presentar o no la normalización clínica de los síntomas tras al menos dos años de evolución, como se muestra en la Tabla 70, únicamente con aquellos SNPs significativos tanto en el test de alelos como en el de genotipos, del mismo modo en que se ha descrito para la susceptibilidad a TDAH. La representación gráfica del riesgo relativo para el individuo que se describe en la Tabla 70 se muestra en la Figura 68, en este caso se muestra que este individuo mostraría el máximo riesgo relativo a no normalización clínica de los síntomas.

Este fenotipo resulta de gran interés, ya que aportaría información valiosa a un paciente diagnosticado de novo al poder determinar si en dos años va a continuar con sintomatología propia de TDAH o va a mostrar normalización clínica de los síntomas con una probabilidad determinada al conocer su genotipo en los SNPs descritos.

Tabla 70.- Tabla que muestra cómo se calcularía la susceptibilidad genética de un individuo a presentar no normalización clínica de los síntomas tras al menos dos años de evolución del trastorno recibiendo tratamiento, según los resultados que se han obtenido en el análisis multicéntrico nacional con 399 muestras de pacientes de TDAH. Se indica el código rs de cada SNP, el gen al que pertenecen, el alelo de riesgo, el valor OR 0 (para el genotipo homocigoto para el alelo que no es de riesgo), OR 1 (genotipo heterocigoto) y OR 2 (genotipo homocigoto para el alelo de riesgo) y el resultado de genotipado para el individuo. Solamente se han incluido aquellos SNPs significativos tanto en el test de alelos como en el de genotipos y los valores de OR se han obtenido del modelo de herencia más parsimonioso en cada caso como se indica: codominante, dominante, recesivo y aditivo. El máximo riesgo se calcula multiplicando los OR 2 (que el individuo posea todos los alelos de riesgo en homocigosis es el riesgo máximo).

| Código rs | Gen | Alelo riesgo | Modelo herencia | OR 0 | OR 1 | OR 2 | Resultado |
|----------------------------------|--------|--------------|-----------------|------|-------------|-------------|------------|
| rs27072 | DAT1 | C | Aditivo | 1,00 | 1,32 | 2,63 | C/C |
| rs10040882 | DAT1 | G | Aditivo | 1,00 | 1,96 | 3,92 | G/G |
| rs250686 | DAT1 | A | Recesivo | 1,00 | 2,72 | 2,72 | A/G |
| rs3808585 | ADRA1A | G | Aditivo | 1,00 | 1,59 | 3,17 | G/G |
| rs1042173 | SLC6A4 | C | Dominante | 1,00 | 2,01 | 2,01 | C/A |
| rs3787283 | SNAP25 | G | Dominante | 1,00 | 1,73 | 1,73 | A/G |
| Riesgo individuo | | | | | | | 309 |
| Máximo riesgo | | | | | | | 309 |
| Riesgo relativo individuo | | | | | | | 1 |

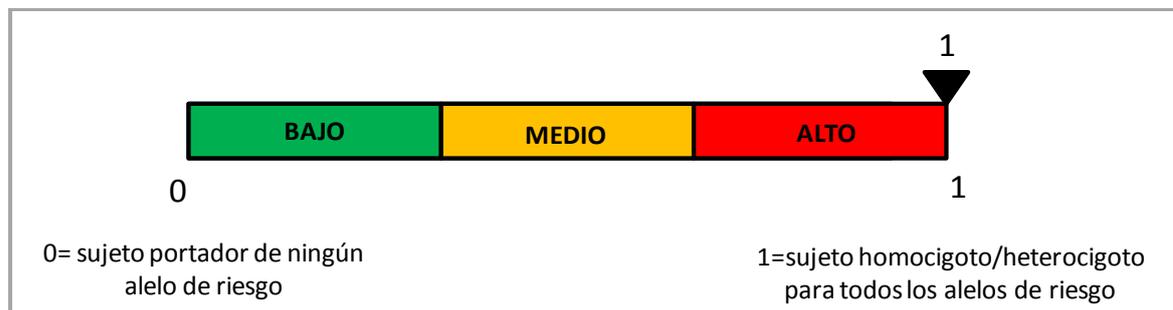


Figura 68.- Representación gráfica del riesgo relativo obtenido para un individuo portador de todos los alelos asociados a no normalización clínica de sintomatología significativos tanto en el test de alelos como en el de genotipos, su genotipo se describe en la Tabla 70. Este individuo mostraría un riesgo relativo alto (el máximo riesgo) a no normalización de la sintomatología tras al menos dos años de seguimiento.

3.2.2. SUBTIPO DE TDAH

El segundo fenotipo asociado a TDAH que nos resultó interesante analizar para poder determinar la diferente evolución y/o respuesta a tratamiento de un paciente, es el subtipo de TDAH al que pertenece. Una de las razones de que la comparación genética entre subtipos sea crucial es que la heterogeneidad en las manifestaciones clínicas y la subdivisión en distintos subtipos están actualmente en entredicho para la próxima versión del DSM-V y podría sugerir que dentro del diagnóstico de TDAH se están incluyendo en la actualidad distintos procesos con mecanismos patogénicos próximos pero diferentes. Asimismo se postula que gran parte de la variabilidad del rasgo hiperactividad-impulsividad, en torno al 70-90%, se debe también a factores genéticos (Herreros et al. 2002).

Sin embargo, en la revisión llevada a cabo recientemente por Stergiakouli y Thapar, postulan que es muy difícil afirmar si los subtipos descritos actualmente en el DSM-IV con objetivos diagnósticos muestran diferencias genéticas entre ellos (Stergiakouli y Thapar 2010). En la población de estudio, se han hallado diferencias genéticas entre los diferentes subtipos analizados, en las dos comparaciones realizadas. En el presente estudio, para analizar la posible asociación entre el fenotipo subtipo de TDAH y los polimorfismos genotipados, se realizaron dos tipos de comparaciones diferentes: el subtipo inatento frente a la suma del subtipo combinado e hiperactivo/impulsivo y el subtipo combinado frente al resto. En el caso del subtipo hiperactivo/impulsivo no había un tamaño muestral suficiente como para compararlo de manera individual con el resto. Aunque a priori el primero de los análisis parece el más lógico, ya que el subtipo inatento se ha postulado como el más diferente al resto e incluso como un trastorno diferente (Grizenko et al. 2010), ambos han dado resultados de asociaciones interesantes que se van a discutir a continuación.

- **Comparación Subtipo inatento vs resto**

La comparación del subtipo inatento frente al resto ha dado como resultado 10 SNPs significativos en 9 genes en el test de alelos, 6 de los cuales mantienen la significación en el test de genotipos. Estos 6 genes pertenecen principalmente a las vías de la neurotransmisión y señalización celular (5HT y glutamato principalmente) y un gen implicado en el metabolismo, estos genes son SULF2, TPH2, GRIN2A, KIAA1486, GRIK1 y GFOD1.

El gen SULF2 codifica la heparán sulfatasa 2. Los heparán sulfato proteoglicanos (HSPGs) actúan como correceptores de numerosos factores de crecimiento y citoquinas involucrados en señalización celular. SULF2 modula las propiedades de estos correceptores eliminando residuos de sulfato, por ello, este gen es esencial en mamíferos para la supervivencia y el desarrollo. SULF2 se encuentra cercano a una región cromosómica asociada al autismo (Allen-Brady et al. 2009). Más recientemente, un GWAS realizado por investigadores de la Universidad de Harvard describió la asociación del alelo G del SNP rs4810685 del gen SULF2 con el debut temprano de

TDAH (Lasky-Su et al. 2008a). En nuestro estudio, el alelo G del SNP rs4810685 del gen SULF2 confiere un riesgo incrementado de subtipo inatento de TDAH (OR=1,57, p=0,01).

La proteína codificada por el gen TPH2 es una enzima que cataliza el primer paso, y paso limitante, de la biosíntesis de 5HT. La 5HT es una potente hormona y un neurotransmisor asociado a numerosos trastornos psiquiátricos, neurológicos y afectivos. En el año 2005 se estableció la primera asociación entre un SNP en el gen TPH2 y el TDAH (Sheehan et al. 2005). Posteriormente, otros GWAS han confirmado esta asociación (Lasky-Su et al. 2008b). Según nuestros resultados, el alelo G del SNP rs4565946 del gen TPH2 confiere un riesgo incrementado de subtipo inatento de la TDAH (OR=1,52; p=0,02).

La vía del glutamato parece una clara candidata a estar involucrada en el desarrollo del TDAH ya que participa en la transmisión sináptica en procesos motores y de memoria y aprendizaje. Smalley y colaboradores describieron una asociación de la región cromosómica 16p13 con TDAH (Smalley et al. 2002), región en la que se localiza el gen GRIN2A, que codifica la subunidad N2A del receptor ionotrópico del glutamato NMDA. Otro estudio posterior describió la asociación del gen GRIN2A específicamente con el TDAH (Turic et al. 2004). En este estudio en población caucásica española el alelo G del SNP rs8049651 del gen GRIN2A se asocia con subtipo inatento del TDAH (OR=1,61, p=0,02).

El gen KIAA1486 codifica una proteína de función desconocida que se expresa en cerebro y otros tejidos. Un GWAS describió la asociación del alelo G del SNP rs1517484 del gen KIAA1486 con el debut temprano de TDAH (Lasky-Su et al. 2008a). En nuestro estudio, este mismo alelo del SNP rs1517484 del gen KIAA1486 confiere un riesgo incrementado de subtipo inatento de la TDAH (OR=1,51, p=0,02).

El gen GRIK1 codifica la subunidad 1 del receptor ionotrópico de glutamato. Los receptores de glutamato son los receptores de neurotransmisores más abundantes en el cerebro de los mamíferos y se activan en una gran variedad de procesos neurofisiológicos. Este gen pertenece a la familia de los receptores de glutamato de tipo kainato, los cuales están compuestos por cuatro subunidades y funcionan como canales de iones activados por ligando. Estudios previos de asociación sugieren que este gen está asociado a epilepsia en la enfermedad de Parkinson, en concreto la señal de asociación más fuerte se observa en el marcador rs363512 (Lasky-Su et al. 2008a). Este gen también se ha asociado con la esquizofrenia (Shibata et al. 2001) y con la epilepsia idiopática generalizada (Luccarini et al. 2007). En nuestro estudio, el alelo G del SNP rs363512 que se localiza en una región intrónica del gen GRIK1 se asocia con el subtipo inatento del TDAH (OR=2,40, p=0,03).

El gen GFOD1 codifica el dominio 1 de una glucosa-fructosa oxirreductasa que se expresa en cerebro y en otros tejidos. Esta proteína está involucrada en el transporte de electrones en

diversos procesos metabólicos. Un metaanálisis ha descrito asociación entre un QTL donde se localiza el gen GFOD1, en concreto la señal de asociación más fuerte se observa en el marcador rs552655, y la esquizofrenia (Lewis et al. 2003). En nuestro estudio el alelo G del SNP rs552655 que se localiza en un intrón del gen GFOD1 se asocia al subtipo inatento de TDAH (OR=1,42, p=0,05).

El resto de polimorfismos genotipados no mostró asociación estadísticamente significativa con el subtipo inatento de TDAH frente a los demás. En el análisis de asociación con el resto de variables clínicas, el subtipo inatento parece estar asociado con la normalización clínica de los síntomas tras al menos dos años de seguimiento, ausencia de antecedentes asociados a TDAH (familiares, de fracaso escolar...) y con la buena respuesta a MTF. Que existan estas asociaciones con las variables clínicas descritas además de con los polimorfismos genéticos apoyaría la teoría de que el subtipo inatento se diferencia lo suficiente del resto como para constituir trastornos diferentes y estaría en concordancia con los resultados publicados por Grizenko y colaboradores (2010).

A pesar de las importantes asociaciones individuales encontradas, no se obtuvo ningún modelo multivariante que conjugara las variables clínicas y los polimorfismos y cuya precisión fuese suficiente (AUC<0,75), por lo que esta aproximación no fue exitosa. Del mismo modo que en los casos anteriores, la susceptibilidad genética relativa de un individuo a presentar subtipo inatento (lo que estaría relacionado con una mayor normalización clínica de los síntomas y una mejor respuesta a MTF en la población de estudio) se podría deducir en forma de producto de los ORs individuales en base a los genotipos en los seis SNPs descritos, tal y como se muestra en la Tabla 71. En la Figura 69 se representa gráficamente el resultado del riesgo relativo para dicho individuo.

No debería olvidarse tanto al interpretar tanto los resultados de este análisis como los del siguiente (en el que se compara al subtipo combinado frente al resto) que, aunque el subtipo asignado a los pacientes es el subtipo resultante tras dos años de evolución y se supone que el trastorno se ha estabilizado, esto no es siempre así. Los comportamientos derivados de las características con las que se evalúan los subtipos (inatención, hiperactividad e impulsividad) se encuentran altamente influenciados por la edad del paciente, ya que no es infrecuente que un niño a lo largo de su evolución pase de un subtipo a otro. Por ejemplo, es frecuente que un paciente diagnosticado con TDAH con subtipo combinado evolucione a un subtipo predominantemente impulsivo a medida que se desarrollan estrategias para focalizar su atención, o que con la edad remita el componente hiperactivo lo que hace que disminuyan el número de casos de subtipo combinado y aumente el de inatentos (Dafny y Yang 2006). Por ello para futuros estudios sería interesante normalizar esta variable en función de la edad de los pacientes, analizando por ejemplo las distintas variables en un rango estrecho de edad.

Tabla 71.- Tabla que muestra cómo se calcularía la susceptibilidad genética relativa de un individuo a presentar subtipo inatento, según los resultados que se han obtenido en el análisis multicéntrico nacional con 399 muestras de pacientes de TDAH. Se indica el código rs de cada SNP, el gen al que pertenecen, el alelo de riesgo, el valor OR 0 (para el genotipo homocigoto para el alelo que no es de riesgo), OR 1 (genotipo heterocigoto) y OR 2 (genotipo homocigoto para el alelo de riesgo) y el resultado de genotipado para el individuo. Solamente se han incluido aquellos SNPs significativos tanto en el test de alelos como en el de genotipos y los valores de OR se han obtenido del modelo de herencia más parsimonioso en cada caso como se indica: codominante, dominante, recesivo y aditivo. El máximo riesgo se calcula multiplicando los OR 2 (que el individuo posea todos los alelos de riesgo en homocigosis es el riesgo máximo).

| Código rs | Gen | Alelo riesgo | Modelo herencia | OR 0 | OR 1 | OR 2 | Resultado |
|----------------------------------|----------|--------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| rs4810685 | SULF2 | G | Aditivo | 1,00 | 1,62 | 3,24 | G/A |
| rs4565946 | TPH2 | G | Recesivo | 1,00 | 1,00 | 2,17 | G/G |
| rs8049651 | GRIN2A | G | Dominante | 1,00 | 3,23 | 3,23 | G/A |
| rs1517484 | KIAA1486 | G | Recesivo | 1,00 | 1,00 | 1,89 | A/A |
| rs363512 | GRIK1 | G | _ | 1,00 | 2,56 | _ | A/G |
| rs552655 | GFOD1 | G | Recesivo | 1,00 | 1,00 | 2,17 | G/G |
| Riesgo individuo | | | | | | | 63 |
| Máximo riesgo | | | | | | | 238 |
| Riesgo relativo individuo | | | | | | | 0,3 |

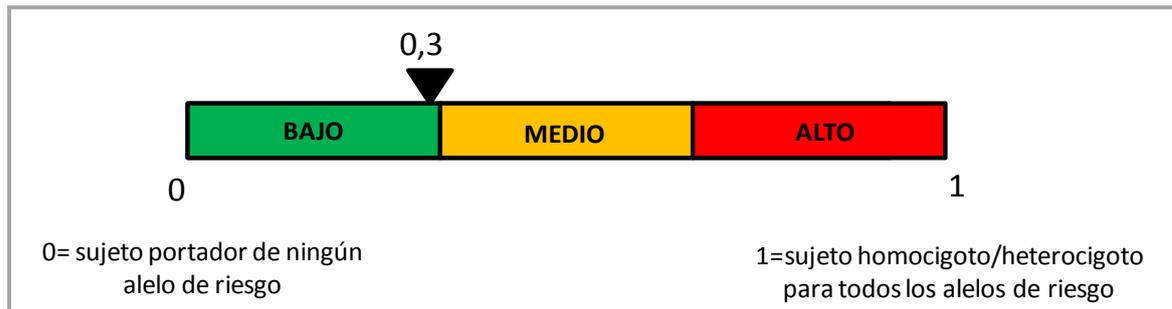


Figura 69.- Representación gráfica del riesgo relativo obtenido para un individuo con los genotipos que se describen en al Tabla 71 para los seis SNPs asociados con riesgo de subtipo inatento de TDAH, significativos tanto en el test de alelos como en el de genotipos. Este individuo mostraría un riesgo relativo bajo aunque cercano al límite establecido para el riesgo medio, a pertenecer al subtipo inatento.

• **Comparación Subtipo Combinado vs Resto**

En la segunda comparación analizada en cuanto al subtipo, al realizar el análisis del subtipo combinado frente al resto, en el test de alelos se obtuvieron 11 SNPs en 11 genes diferentes que mostraban asociación significativa con este subtipo. Sólo cuatro de ellas mostraron también significación en el test de genotipos (SLC6A3, SLC1A3, GPC6 e ITGAE). Estos cuatro genes pertenecen a las vías de neurotransmisión de la DA y el glutamato (transportadores de ambos) y a mecanismos de crecimiento, división y adhesión celular.

Como ya se ha comentado, el gen SLC6A3/DAT1 codifica un miembro de la familia de transportadores, en concreto el de DA. La variante alélica C del SNP rs27072 de este gen se ha asociado a un riesgo incrementado de hiperactividad, impulsividad y déficit de atención en un estudio realizado con gemelos (Ouellet-Morin et al. 2008) y en nuestro estudio, este mismo alelo se ha asociado a un riesgo incrementado de no normalización clínica (OR=1,75; p = 0,01). En lo que respecta al subtipo de TDAH, nuestros datos muestran una asociación entre el alelo C del SNP rs27072 y un riesgo incrementado de desarrollar el subtipo combinado de TDAH frente al resto de subtipos (OR=1,91; p<0,01).

El gen SLC1A3 da lugar a otro transportador, en este caso el transportador de glutamato glial de alta afinidad. Este transportador es esencial para terminar la acción post-sináptica, ya que se encarga de eliminar el glutamato liberado al espacio sináptico. La proteína SLC1A3 se expresa en cerebelo, cortex frontal, hipocampo y ganglios basales, y se han descrito episodios de ataxia, apoplejía y migraña asociados a defectos en esta proteína. Un reciente GWAS de TDAH ha identificado señales de asociación nominal en SNPs localizados en el gen SLC1A3 (Elia et al. 2009c). Además, en un estudio previo realizado en el Reino Unido con 299 familias afectadas de TDAH, se encontró asociación entre el alelo A del SNP rs2269272 del gen SLC1A3 y la enfermedad (Turic et al. 2005). En nuestro estudio el alelo A del SNP rs2269272 confiere un riesgo incrementado de desarrollar el subtipo combinado de TDAH (OR=1,84; p=0,01).

El gen GPC6 codifica la proteína glypican 6, un tipo de heparán sulfato proteoglicano de membrana, anclado a glicosil fosfatidil inositol (GPI), e implicado en el control del crecimiento y de la división celular. El glypican 6 es un potencial receptor de membrana para factores de crecimiento y se ha relacionado con varios tipos de cáncer. En un GWAS realizado con 343 pacientes TDAH de origen alemán y 250 controles, el SNP rs7995215 situado en el gen GPC6 se encontró asociado muy significativamente al riesgo de TDAH (Lesch et al. 2008). Se desconoce el papel de esta proteína en el origen o evolución de la enfermedad. Sin embargo, en concordancia con el GWAS, en nuestro estudio el alelo A se asocia a un mayor riesgo de desarrollar el subtipo combinado de TDAH (OR=1,57; p<0,01).

El gen ITGAE codifica la integrina alfa E. Las integrinas son proteínas integrales de membrana, heterodiméricas, que participan en procesos de adhesión celular. Al igual que en el caso del glypican 6, se desconoce el papel de esta proteína en el origen o evolución del TDAH, pero el SNP rs220470 localizado en el gen GPC6 se encontró asociado muy significativamente al riesgo de TDAH en el GWAS alemán (Lesch et al. 2008). En esa misma línea, nuestros resultados sugieren que el alelo G del SNP rs220470 tienen una probabilidad incrementada de desarrollar el subtipo combinado de TDAH (OR=1,60; p = 0,01).

Con el resto de polimorfismos genotipados no se ha encontrado asociación significativa, pero sí con las mismas variables clínicas que en el caso del subtipo inatento pero la asociación

en sentido contrario, como es lógico. El subtipo combinado se encuentra estrechamente relacionado con una mayor no normalización clínica de los síntomas tras al menos dos años de seguimiento, con la presencia de antecedentes personales asociados a TDAH y con una peor respuesta a tratamiento.

La aproximación de modelo multivariante tampoco fue exitosa en esta comparación, ya que el modelo obtenido no mostraba precisión suficiente, definida como $AUC < 0,75$. Sin embargo la susceptibilidad genética (riesgo relativo) de un individuo a presentar subtipo combinado podría calcularse como se describe en la Tabla 72 y como se representa gráficamente en la Figura 70.

Existen estudios (Short 2007, Baeyens 2006 y Stawicki 2006) que afirman que los diferentes subtipos reflejan diferencias cuantitativas en severidad pero no cualitativas y se apoyan en el hecho de que la mayoría de niños cambian de subtipo al menos dos veces en ocho años. Relacionado con estas opiniones está la nueva corriente de pensamiento que defiende un TDAH dimensional (Toplak 2009) en el que se enfoca como un trastorno único con dos dimensiones de falta de atención e hiperactividad en vez de los subtipos categóricos tradicionales. Los síntomas estarían presentes en grados diferentes pero en un continuo. Éste es el planteamiento que defiende Bauermeister entre otros para clasificar el TDAH en la nueva edición del Manual Diagnóstico DSMV, que tiene prevista su publicación en el año 2013, apoyándose en la evidencia transcultural de la validez de estas dos dimensiones en 15 estudios publicados (Bauermeister 2010). Han sido propuestos varios cambios, entre ellos:

- 1) Mantener los síntomas actuales pero cambiar el concepto de subtipos a dimensiones sintomatológicas,
- 2) Mantener como TDAH solamente al subtipo combinado y renombrar los subtipos déficit de atención e hiperactividad como nuevos trastornos,
- 3) Incluir mayor número de síntomas de impulsividad,
- 4) Aumentar la edad de inicio de los síntomas hasta los 12 años,
- 5) Especificación del trastorno en adultos,
- 6) Que el trastorno generalizado del desarrollo o el espectro autista dejen de ser criterios excluyentes.

Aunque de momento no haya consenso sobre la clasificación en subtipos o dimensionales, las vías que parecen estar asociadas con esta sintomatología diferencial (llámense subtipos de TDAH o trastornos diferentes) son las clásicas de neurotransmisión dopaminérgica (DAT1), serotoninérgica (TPH2) y glutamatérgica (GRIN2A, GRIK1 y SLC1A3) pero también otras vías de reciente asociación como son la adhesión, señalización y división celular (ITGAE, GPC6, SULF2), además del metabolismo (GFOD1).

Tabla 72.- Tabla que muestra cómo se calcularía la susceptibilidad genética relativa de un individuo a presentar subtipo combinado, según los resultados que se han obtenido en el análisis multicéntrico nacional con 399 muestras de pacientes de TDAH. El color rojo indica la presencia del alelo de riesgo. Se indica el código rs de cada SNP, el gen al que pertenecen, el alelo de riesgo, el valor OR 0 (para el genotipo homocigoto para el alelo que no es de riesgo), OR 1 (genotipo heterocigoto) y OR 2 (genotipo homocigoto para el alelo de riesgo) y el resultado de genotipado para el individuo. Solamente se han incluido aquellos SNPs significativos tanto en el test de alelos como en el de genotipos y los valores de OR se han obtenido del modelo de herencia más parsimonioso en cada caso como se indica: codominante, dominante, recesivo y aditivo. El máximo riesgo se calcula multiplicando los OR 2 (que el individuo posea todos los alelos de riesgo en homocigosis es el riesgo máximo).

| Código rs | Gen | Alelo riesgo | Modelo herencia | OR 0 | OR 1 | OR 2 | Resultado |
|----------------------------------|--------|--------------|-----------------|------|-------------|-------------|------------|
| rs27072 | SLC6A3 | C | Recesivo | 1,00 | 1,00 | 3,75 | C/C |
| rs2269272 | SLC6A3 | A | Aditivo | 1,00 | 1,71 | 3,42 | A/A |
| rs7995215 | GPC6 | A | Aditivo | 1,00 | 1,54 | 3,08 | A/G |
| rs220470 | ITGAE | G | Aditivo | 1,00 | 1,67 | 3,33 | A/G |
| Riesgo individuo | | | | | | | 33 |
| Máximo riesgo | | | | | | | 132 |
| Riesgo relativo individuo | | | | | | | 0,3 |

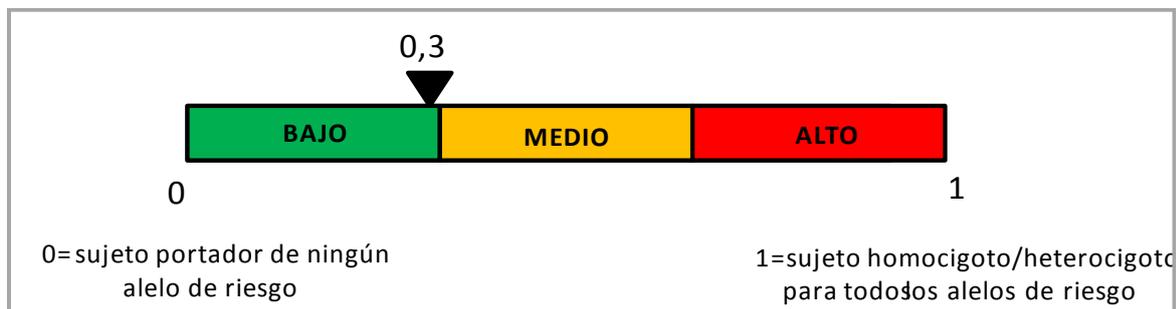


Figura 70.- Representación gráfica del riesgo relativo obtenido para el individuo cuyo genotipo para los SNPs asociados a riesgo de subtipo combinado de TDAH significativos tanto en el test de alelos como en el de genotipos, se describe en la Tabla 72. Este individuo mostraría un riesgo relativo bajo (pero cercano a medio) a pertenecer al subtipo combinado.

3.2.3. SEVERIDAD

El tercer fenotipo que se ha analizado es el de la severidad de los síntomas calculado según la escala ICG evaluada por el investigador, ya que parecía ser un factor importante en la evolución de los pacientes y estrechamente relacionado con la normalización clínica de los síntomas. En el test de alelos se obtuvieron siete SNPs que mostraban asociación significativa con el fenotipo en siete genes diferentes, pero sólo tres de ellas se confirmaron también en el test de genotipos. Sólo uno de ellos pertenece a una de las vías clásicamente asociadas con el TDAH, como es la de neurotransmisión del glutamato (GRIN2B); los otros dos son de reciente asociación y aun se desconoce si se trata de asociaciones directas o indirectas, ya que la

implicación de una peptidasa de la membrana interna mitocondrial y del colágeno con el conocimiento actual que se dispone acerca del TDAH es difícil de explicar (ADAMTS2, IMMP2L).

El gen ADAMTS2 codifica una proteína con actividad desintegrina y metaloproteínasa, que se encarga de romper N-pro-péptidos de los colágenos I, II y V, para que puedan formar posteriormente las estructuras fibrilares típicas del colágeno. También es probable que la proteína participe en el desarrollo embrionario. El SNP rs10039254, junto con otros 3 SNPs localizados todos en regiones intrónicas del gen ADAMTS2, se ha asociado con la edad de debut del TDAH en un GWAS (Lasky-Su et al. 2008a). Sin embargo, no existen publicaciones previas o datos biológicos que permitan establecer una hipótesis sencilla sobre el papel de este gen en la etiología del TDAH. También se desconoce si este gen juega un papel directo en la enfermedad, o si bien la señal de asociación detectada en el SNP rs10039254 es debida a LD con otros SNPs localizados en genes que tienen una relación causal con el TDAH. En cualquier caso, en concordancia con el GWAS, nuestro estudio también reveló una asociación significativa entre el alelo A del SNP rs10039254 y la severidad del TDAH, en base a la escala ICG (OR=1,53; p=0,04).

La proteína codificada por el gen IMMP2L forma parte del complejo peptidasa de la membrana interna mitocondrial (IMP) que da lugar, mediante proteólisis, a proteínas maduras y activas. El gen IMMP2L se localiza dentro del locus 7q22 AUTS1 de riesgo de autismo y se han identificado polimorfismos en este gen asociados a TDAH, autismo, esquizofrenia y síndrome de Tourette (Elia et al. 2009c). En concreto, el SNP rs6968385 se ha asociado a edad de debut temprana del TDAH en un GWAS (Franke et al. 2009, Lasky-Su et al. 2008a). En nuestro estudio, el alelo A del SNPs rs6968385 se asocia con síntomas más severos de su enfermedad (OR=1,64; p = 0,01).

El gen GRIN2B da lugar a la subunidad N2B del receptor ionotrópico NMDA del glutamato. El receptor GRIN2B parece ser responsable de aumentar la eficiencia de la transmisión sináptica en procesos relacionados con la memoria y el aprendizaje. Un estudio sobre SNPs relacionados con el TDAH, el trastorno de la conducta (CD) y el trastorno de oposición desafiante (ODD), estableció asociación entre un polimorfismo del gen GRIN2B y estos trastornos. Además, este polimorfismo fue incluido en un modelo multivariante para explicar el CD y el ODD (Comings et al. 2000a). Más recientemente, un estudio canadiense realizado en 205 familias con miembros afectados de TDAH identificó 3 SNPs (rs2268115, rs2284411 y rs2284407) localizados en el intrón 3 del gen GRIN2B asociados con la enfermedad (Dorval et al. 2007). Aunque la señal de asociación más intensa fue detectada en el SNP rs2284411 (p=0,005), observaron una asociación significativa del alelo A del SNP rs2268115 con el TDAH (p = 0,02) y con la presencia de síntomas inatento e hiperactivo/impulsivo, pero no con síntomas cognitivos de memoria verbal. Nuestros resultados sugieren que el alelo A del SNP rs2268115 confiere una probabilidad incrementada de desarrollar síntomas severos de su enfermedad (OR=1,59; p = 0,01).

El resto de los polimorfismos genotipados no mostraron asociación significativa con la severidad de los síntomas aunque se encontró asociación con dos de las variables clínicas analizadas. Se encontró asociación en la población estudiada entre la severidad, la presencia de comorbilidades y la no normalización clínica de los síntomas. Ambas variables, la severidad y normalización clínica de los síntomas se refieren en realidad al mismo hecho, a la sintomatología del TDAH. La diferencia es que la primera de ellas está evaluada por el clínico según la escala ICG y la segunda por el paciente o tutor legal en el caso de menores. Por ello, parece lógico pensar que ambas estén relacionadas. Sin embargo, ni el número de pacientes comparados en cada análisis (severos n=270 y leves n=83 frente a normalización n=210 y no normalización n=144) ni los polimorfismos asociados de forma significativa coinciden. Este hecho hace necesario analizar ambas variables por separado, ya que parecen aportar informaciones diferentes y complementarias acerca de la evolución de la sintomatología de un paciente, una evaluada por el clínico y la otra por los padres o el propio paciente. Ello que indicaría que existe una diferencia en la percepción de la sintomatología según quién sea el evaluador y por lo tanto un importante sesgo que podría afectar a los resultados de asociación.

El análisis multivariante por el contrario, no mostró ningún modelo con precisión suficiente (AUC<0,75), por lo que se propone calcular la susceptibilidad genética de un individuo a presentar una mayor severidad sintomatológica de TDAH (ICG>3), como en los casos anteriores, con los tres SNPs que mostraron asociación significativa tanto en el test de alelos como en el de genotipos, como se describe en la Tabla 73, el riesgo relativo resultante se ha representado gráficamente y se muestra en la Figura 71.

Tabla 73.- Tabla que muestra cómo se calcularía la susceptibilidad genética de un individuo a presentar mayor severidad de la sintomatología del TDAH, entendida como ICG>3 tras al menos dos años de seguimiento y tratamiento, según los resultados que se han obtenido en el análisis multicéntrico nacional con 399 muestras de pacientes de TDAH. El color rojo indica la presencia del alelo de riesgo. Se indica el código rs de cada SNP, el gen al que pertenecen, el alelo de riesgo, el valor OR 0 (para el genotipo homocigoto para el alelo que no es de riesgo), OR 1 (genotipo heterocigoto) y OR 2 (genotipo homocigoto para el alelo de riesgo) y el resultado de genotipado para el individuo. Solamente se han incluido aquellos SNPs significativos tanto en el test de alelos como en el de genotipos y los valores de OR se han obtenido del modelo de herencia más parsimonioso en cada caso como se indica: codominante, dominante, recesivo y aditivo. El máximo riesgo se calcula multiplicando los OR 2 (que el individuo posea todos los alelos de riesgo en homocigosis es el riesgo máximo).

| Código rs | Gen | Alelo riesgo | Modelo herencia | OR 0 | OR 1 | OR 2 | Resultado |
|----------------------------------|---------|--------------|-----------------|------|-------------|-------------|------------|
| rs10039254 | ADAMTS2 | A | Recesivo | 1,00 | 1,00 | 3,06 | A/A |
| rs6968385 | IMMP2L | A | Aditivo | 1,00 | 1,60 | 3,2 | G/A |
| rs2268115 | GRIN2B | A | Recesivo | 1,00 | 1,00 | 2,22 | A/A |
| Riesgo individuo | | | | | | | 11 |
| Máximo riesgo | | | | | | | 22 |
| Riesgo relativo individuo | | | | | | | 0,5 |

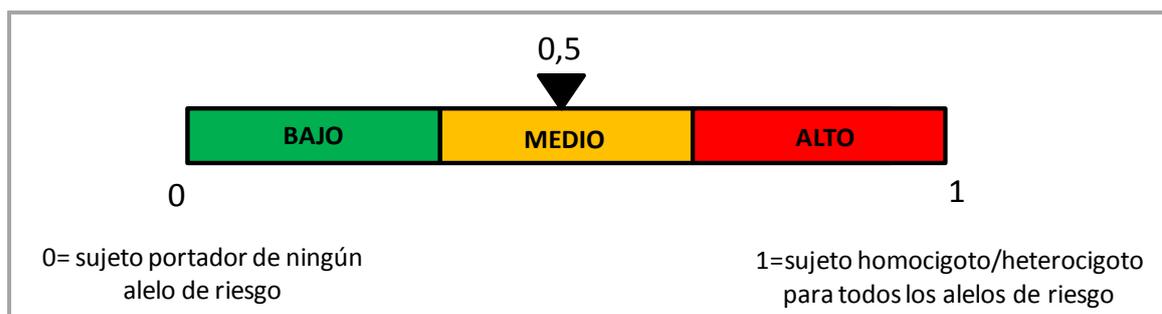


Figura 71.- Representación gráfica del riesgo relativo obtenido para el individuo cuyos genotipos para los SNPs asociados a riesgo de mayor severidad de TDAH, significativos tanto en el test de alelos como en el de genotipos, se describen en la Tabla 73. Este individuo mostraría un riesgo relativo medio a padecer un TDAH severo.

3.2.4. COMORBILIDAD

La presencia o ausencia de comorbilidades es un factor determinante a la hora de evaluar la respuesta a tratamiento del TDAH, ya que en torno al 30% de los pacientes de TDAH las presenta, lo que empeora su pronóstico de evolución. Además, el 47% de los individuos con comorbilidad muestra más de un trastorno comórbido (Artigas-Pallarés 2003; Shaw et al. 2007a), siendo estos trastornos en ocasiones más incapacitantes que el propio TDAH y siempre de suma importancia para el tratamiento y evolución del paciente, ya que requieren una atención especial (Díaz Atienza J. 2006). Un ejemplo de ello es el resultado que obtuvieron Jensen y colaboradores en el estudio de tratamiento multimodal de TDAH que llevaron a cabo, estos autores comprobaron la superior eficacia del MTF, en prescripción adecuada sobre cualquier otra medida, excepto en el subgrupo comórbido con trastornos emocionales, donde encontraron que la eficacia era comparable a la de la terapia cognitivo-conductual (Jensen et al. 2001). Díaz-Atienza postula que si fuésemos capaces de delimitar claramente en cada paciente sus dificultades específicas y “sobreañadidas” al TDAH e implementar una intervención individualizada, su evolución mejoraría notablemente (Díaz Atienza J. 2006). Estudios con gemelos han encontrado de hecho, que los síntomas de TDAH y de autismo comparten un riesgo heredado común (en la próxima versión del manual diagnóstico DSM-V probablemente el autismo será eliminado como criterio excluyente de TDAH) (Ronald et al. 2008). Si dispusiéramos del suficiente tamaño muestral en cada una de las comorbilidades descritas, sería de gran interés poder analizar si existen variantes asociadas no sólo a la presencia de comorbilidades si no a cada una de ellas en concreto, pero por el momento no es posible tal análisis.

Por todo ello, se planteó el análisis de asociación entre los polimorfismos genotipados y la variable clínica presencia/ausencia de comorbilidades. En el test de alelos se obtuvieron siete SNPs que mostraban asociación significativa en cuatro genes y el locus LOC728594 que codifica para una proteína hipotética. En el posterior test de genotipos solamente se confirmaron dos asociaciones, las correspondientes a los genes DBH y NTF3 ambos implicados en procesos neuronales como son la transmisión de señales neuronales y la diferenciación de estas células altamente especializadas.

Como se ha comentado anteriormente, la proteína dopamina β hidroxilasa codificada por el gen DBH está presente en las vesículas sinápticas de neuronas postganglionares del sistema simpático y se encarga de convertir la DA en NA. Tanto el gen en general como el SNP con código rs2519152 se han asociado con el TDAH en numerosas publicaciones (Daly et al. 1999; Elia y Devoto 2007; Kirley et al. 2002; Roman et al. 2002; Tang et al. 2006) incluso en un GWAS (Lasky-Su et al. 2008b). En nuestro estudio el alelo A del SNP rs2519152 confiere un mayor riesgo de desarrollar comorbilidad (OR=1,41; $p = 0,03$) además de presentar asociación con la no normalización clínica de los síntomas ($p=0,04$), lo que podría estar interrelacionado entre sí, ya que ambas variables clínicas también muestran una asociación estadísticamente significativa entre sí.

El gen NTF3 codifica la neurotrofina 3, una proteína que controla la supervivencia y la diferenciación neuronal en mamíferos. Un estudio realizado en población española con 546 pacientes TDAH y 546 controles emparejados por sexo, demostró que los sujetos portadores del alelo A del SNP rs7956189 del gen NTF3 tenían un riesgo incrementado de sufrir TDAH, incluso después de estratificar a los pacientes por subtipo de TDAH (Ribases et al. 2009h). La asociación entre el alelo A de este SNP y el TDAH fue confirmada posteriormente en una cohorte de adultos (Conner et al. 2008).

En concordancia con estos resultados, nuestro estudio indica que el alelo A del SNP rs7956189 y el alelo G del SNP rs6489630 confieren un riesgo incrementado de comorbilidad (OR=1,78 y 1,53 respectivamente; $p=0,01$ y $0,03$ respectivamente).

En los análisis de asociación univariante de las variables clínicas se encontró asociación estadísticamente significativa entre la presencia de comorbilidades y un fenotipo de TDAH más severo y una no normalización clínica de los síntomas en la población estudiada. Esto estaría apoyando lo descrito en la literatura, ya que se ha descrito que la presencia de comorbilidades en el TDAH implicaría una peor evolución de la sintomatología de TDAH y un tratamiento más complejo y específico del trastorno (Díaz Atienza 2006). Ambas variables con las que se asocia la comorbilidad, están además asociadas entre sí (severidad y no normalización asociadas entre sí). A pesar de que en la literatura también se ha descrito una asociación entre la presencia y variedad de comorbilidades con el subtipo combinado de TDAH (Díaz Atienza 2006), en nuestra población no se ha replicado dicha asociación.

La aproximación de modelo multivariante tampoco fue exitosa en esta comparación incluyendo los polimorfismos y las variables clínicas, ya que el modelo obtenido no mostraba precisión suficiente, siendo su $AUC < 0,75$. Sin embargo, la susceptibilidad genética de un individuo a presentar comorbilidades (una o más) podría calcularse al igual que en el resto de fenotipos, como el producto de los ORs individuales que aporta cada genotipo, como se describe en la Tabla 74, el riesgo relativo obtenido se representa gráficamente en la Figura 72.

Tabla 74.- Tabla que muestra cómo se calcularía la susceptibilidad genética de un individuo a presentar comorbilidades (al menos una), tras al menos dos años de seguimiento desde el diagnóstico, según los resultados de asociación que se han obtenido en el análisis multicéntrico nacional con 399 muestras de pacientes de TDAH. El color rojo indica la presencia del alelo de riesgo. Se indica el código rs de cada SNP, el gen al que pertenecen, el alelo de riesgo, el valor OR 0 (para el genotipo homocigoto para el alelo que no es de riesgo), OR 1 (genotipo heterocigoto) y OR 2 (genotipo homocigoto para el alelo de riesgo) y el resultado de genotipado para el individuo. Solamente se han incluido aquellos SNPs significativos tanto en el test de alelos como en el de genotipos y los valores de OR se han obtenido del modelo de herencia más parsimonioso en cada caso como se indica: codominante, dominante, recesivo y aditivo. El máximo riesgo se calcula multiplicando los OR 2 (que el individuo posea todos los alelos de riesgo en homocigosis es el riesgo máximo).

| Código rs | Gen | Alelo riesgo | Modelo herencia | OR 0 | OR 1 | OR 2 | Resultado |
|----------------------------------|------|--------------|-----------------|------|------|------|------------|
| rs7956189 | NTF3 | A | Aditivo | 1,00 | 1,79 | 3,57 | A/G |
| rs2519152 | DBH | A | Dominante | 1,00 | 2,27 | 2,27 | A/G |
| Riesgo individuo | | | | | | | 4 |
| Máximo riesgo | | | | | | | 8 |
| Riesgo relativo individuo | | | | | | | 0,5 |

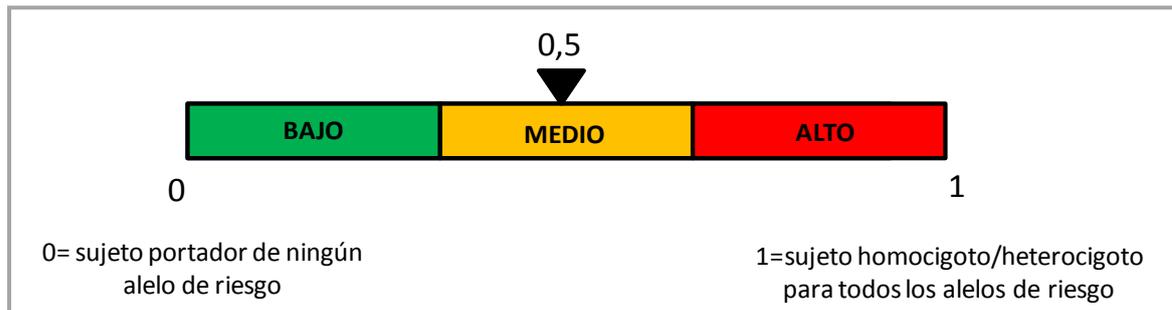


Figura 72.- Representación gráfica del riesgo relativo obtenido para un individuo heterocigoto para los dos SNPs asociados con la presencia de comorbilidades, significativos tanto en el test de alelos como en el de genotipos, que se describen en la Tabla 73. Este individuo mostraría un riesgo relativo medio a presentar uno o más trastornos comórbidos al TDAH.

3.3. RESPUESTA A ATOMOXETINA (ATX)

La atomoxetina (ATX) es el primer fármaco no estimulante aprobado para el tratamiento del TDAH en niños, adolescentes y adultos. Es metabolizada por el citocromo CYP2D6. Se conoce que existen un gran número de variantes alélicas en el gen que codifica para el CYP2D6, que hace que su actividad enzimática sea extremadamente variable (Ring et al. 2002). Se ha descrito que los metabolizadores pobres muestran una mayor mejoría en los síntomas de TDAH que los metabolizadores extensivos, probablemente debido a las mayores concentraciones plasmáticas del fármaco y es más probable que continúen con la terapia que el resto de individuos (Stein y McGough 2008). Sin embargo, también muestran tasas más altas de descenso de apetito, insomnio y variaciones en la presión sanguínea.

Contradiendo lo anteriormente descrito, en el análisis univariante de asociación con los fenotipos metabolizadores obtenidos a partir del genotipado del CYP2D6 que se ha realizado en este estudio, no se han encontrado asociaciones estadísticamente significativas. Se analizó si existía asociación entre el fenotipo metabolizador del CYP2D6 y la respuesta a ATX calculada en función de si existía o no normalización clínica de los síntomas, comparando los distintos tipos de metabolizadores entre sí. Los cuatro tipos de metabolizadores (ultrarrápidos, normales, intermedios y lentos) y las frecuencias obtenidas de cada uno de ellos se ajustan a lo descrito bibliográficamente. Las muestras genotipadas fueron solamente 58 (ya que eran los únicos pacientes que habían recibido ATX como tratamiento), por lo que esta falta de significación podría ser explicada por el pequeño tamaño muestral, puesto que en alguno de los grupos que se compararon había únicamente 11 individuos.

Al realizar el análisis univariante entre la respuesta a ATX y las variables clínicas presencia/ausencia de comorbilidades y antecedentes asociados a TDAH y subtipo de TDAH, tampoco se encontró asociación significativa entre ninguna de ellas, lo que podría ser debido también al bajo número de muestras incluidas en el análisis.

Sería interesante poder realizar de nuevo esta parte del estudio incluyendo un mayor número de muestras, además se podrían normalizar los datos en función de las dosis recibidas si se dispusiera de esta información. Los estudios de farmacogenética del TDAH tradicionalmente se han centrado en los genes de las vías catecolaminérgicas y en la respuesta a MTF. Sin embargo, los esfuerzos futuros deberían encaminarse a examinar un rango más amplio tanto de fármacos estimulantes como no estimulantes (Stein y McGough 2008). Del mismo modo, podría ser de gran interés realizar un estudio prospectivo en el que se controlen además ciertas variables que pudieran distorsionar el resultado del test de asociación, como son la adherencia real al tratamiento, la aparición de efectos secundarios, el periodo de toma del medicamento, etc.

3.4. RESPUESTA A METILFENIDATO (MTF)

El MTF es el tratamiento estimulante más utilizado actualmente en el tratamiento del TDAH, y a pesar de su demostrada eficacia para tratar la sintomatología asociada a este trastorno, un 20 % de los pacientes no responde adecuadamente, bien porque la evolución de los síntomas no es la adecuada, bien porque los efectos secundarios que se producen superan a los beneficios obtenidos. Es en estos casos se recurre a otro tipo de medicación. Mediante la técnica de ensayo y error se utilizan una serie de fármacos alternativos. Incluso entre los que responden favorablemente a la medicación, existe una gran variabilidad interindividual en la dosis óptima, duración del efecto y tolerabilidad. En este estudio se planteó si mediante el genotipado de ciertos polimorfismos, previamente asociados en la literatura con la respuesta a este estimulante

del SNC, se podría determinar si un individuo iba a responder bien o mal sin necesidad de administrarle el fármaco.

Para evaluar la respuesta a MTF se ha considerado la buena o mala respuesta a MTF en función de la normalización clínica de los síntomas. Se consideró buena respuesta si existía normalización clínica de los síntomas y mala respuesta en ausencia de dicha normalización, para todos los sujetos que en el momento de inclusión de muestras al estudio (momento final) estaban tratados con MTF. Se han considerado como malos respondedores a MTF todos los sujetos que habían sido tratados con MTF anteriormente y se les había cambiado el tratamiento y aquellos sujetos que además de MTF necesitan ser tratados con algún otro fármaco.

Se realizó un test de alelos con SNPs y reordenamientos en el que se comparó buena (n=167) vs mala respuesta (n=198) en función de si existía normalización clínica de los síntomas como se ha descrito, pero no se obtuvo ninguna asociación estadísticamente significativa a pesar de contar con polimorfismos suficientemente referenciados en la bibliografía como asociados a la respuesta a MTF, como son DAT1 y DRD4 (Cheon et al. 2005; Kim et al. 2005; Kirley et al. 2003; Kooij et al. 2007; Leddy et al. 2009; McGough et al. 2009; Roman et al. 2002; Stein et al. 2005; van der Meulen et al. 2005; Mick et al. 2006; Winsberg y Comings 1999; Zeni et al. 2007; Contini et al. 2010; Froehlich et al. 2010; Kieling et al. 2010; Szobot et al. 2010) y el resto de polimorfismos incluidos en menor medida.

Este hecho puede ser debido a las características propias de este experimento o a que realmente no exista asociación entre los polimorfismos y la respuesta a MTF en la población de estudio (española), ya que los estudios publicados han sido realizados en poblaciones de origen étnico diferente. Con las características propias del experimento se hace referencia al hecho de que por tratarse de un estudio retrospectivo no se han podido controlar ciertas variables que podrían estar enmascarando los resultados, como son principalmente:

- a) la falta de información sobre las dosis recibidas, el periodo de tratamiento y la adherencia al mismo,
- b) en la mayoría de individuos se desconoce si a los pacientes se les ha cambiado de tratamiento por no mejoría sintomatológica o por aparición de efectos secundarios,
- c) no existe una población de pacientes “naive” (pacientes que no han recibido tratamiento) para realizar las comparaciones, ya que no sería una práctica ética no tratar a un paciente con TDAH.

La hipótesis de que en realidad no existe asociación entre los polimorfismos analizados y la población de estudio podría estar apoyada por la gran controversia existente en relación a los alelos asociados en los diferentes genes. Por ejemplo con la repetición en tándem (VNTR) de la región 3'UTR del gen DAT1, uno de los más ampliamente estudiados por su posible asociación

con la respuesta a MTF, se obtienen resultados contradictorios. En varios estudios se ha asociado la variante de 10-R (480 pb) a no-respondedores (Cheon et al. 2005; Roman et al. 2002); mientras que en otros estudios asocian la posesión de uno o dos alelos de 10-R con una mayor mejoría de los síntomas tras recibir MTF (Kirley et al. 2003; Stein et al. 2005). Por el contrario, otros autores no encontraron asociación entre esta VNTR y la respuesta a MTF (Kim et al. 2005; McGough et al. 2009; van der Meulen et al. 2005; Contini et al. 2010a). Si bien es cierto que el tamaño muestral (y por tanto la potencia estadística), la edad y el origen étnico de las poblaciones varían entre los diferentes estudios, esta asociación está lejos de ser concluyente. Lo mismo ocurre en el caso del gen DRD4 (Froehlich et al. 2010) y en el caso del resto de polimorfismos analizados la información disponible es aun escasa.

Por el contrario, se ha observado una mejor respuesta a MTF del subtipo inatento versus al subtipo hiperactivo/impulsivo o combinado, siendo los porcentajes de respuesta del 61,2%, 40%, y 40,4%, respectivamente. Este resultado discrepa con el estudio descrito por Solanto y colaboradores en el que no encontraban diferencias estadísticamente significativas en la respuesta a MTF entre los subtipos más frecuentes, subtipos inatento y combinado (Solanto et al. 2009) El estudio realizado por Solanto y colaboradores es el primer estudio que recluta exclusivamente niños diagnosticados de TDAH que no habían sido tratados farmacológicamente previamente con el objetivo de analizar las diferencias en la respuesta a MTF según el subtipo de la enfermedad. También discrepa con los resultados que recientemente han encontrado con modelos animales de los subtipos inatento (rata WKY/NCrI Wistar Kyoto) y combinado (rata hipertensiva SHR/NCrI) tratados con MTF. El modelo animal de subtipo combinado en respuesta al tratamiento con MTF reduce significativamente más sus niveles de transportadores de dopamina (DAT) que el modelo de subtipo inatento. Siendo, además, la reducción de los niveles de DAT más efectiva si se realiza antes de la pubertad (Roessner et al. 2010).

Se obtuvo una asociación significativa entre la variable clínica respuesta a MTF y subtipo de TDAH, tanto al comparar al subtipo inatento frente al resto como al combinado frente al resto. Con el hiperactivo no se obtuvo asociación probablemente debido a que el número de pacientes de este subtipo es muy inferior a la del resto y que la mayor diferencia en respuesta a MTF se encuentra entre el subtipo inatento y combinado.

Por otro lado, no se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa al comparar a la población tratada únicamente con MTF frente a la tratada con MTF y algún otro fármaco. Esto podría ser debido a que la opción MTF más algún otro fármaco está incluyendo una gran variedad de fármacos muy distintos entre sí, además de que, como se ha mencionado anteriormente, no ha sido posible normalizar los datos en función de las dosis recibidas. Asimismo la elección de un segundo o tercer fármaco para el tratamiento del TDAH no deja de ser una elección más o menos subjetiva del clínico que puede estar más o menos familiarizado con un tipo de tratamiento frente a otro o más sensibilizado con una patología comórbida que con

otra y puede influir en su elección del tratamiento. Lo que el presente estudio refleja es que no existe una diferencia significativa en el genotipo de los individuos que reciben solamente MTF frente a los que además necesitan ser tratado con algún otro medicamento en la población analizada. De la misma forma no se encontró asociación entre la buena/mala respuesta a MTF y la presencia/ausencia comorbilidades o la presencia/ausencia de antecedentes personales asociados a TDAH vs respuesta a MTF.

Sería de gran interés, como se ha comentado en el caso de la respuesta a ATX, poder llevar a cabo un estudio prospectivo en el que se controlen muy bien las variables que se han mencionado (dosis, periodo de tratamiento, adherencia, mejora sintomatológica y efectos secundarios) para determinar si se replican o se descartan las asociaciones descritas en población española ya que en este estudio no se han confirmado. Respecto a este tema y aunque la mayor parte de estudios sobre la farmacogenética del TDAH se han centrado en buscar predictores genéticos de la mejoría de los síntomas, una aplicación clínica más práctica y que no debería relegarse a un segundo plano es la predicción de la aparición de efectos secundarios y tolerabilidad a la medicación (Stein y Mc Gough 2008). En el año 2009, en la Conferencia sobre Genética Molecular celebrada en Bruselas, se establecieron una serie de principios a tener en cuenta para llevar a cabo futuros estudios sobre la farmacogenética del TDAH con la idea de realizar este tipo de estudios de forma más uniforme y reglada. Entre estos principios se incluía: que los estudios futuros sean metodológicamente rigurosos (aleatorizados y controlados con placebo), que la respuesta se mida de formas diferentes y en distintos puntos de tiempo, que se mida tanto la mejoría de síntomas como la aparición de efectos secundarios, que se examinen múltiples genes, que el tamaño muestral sea suficiente y que se lleven a cabo los controles de genotipado necesarios, entre otros (Stein y McGough 2008).

Una indicación de mayor predisposición de efectos secundarios podría ayudar al clínico con la elección del fármaco idóneo, además de poder ajustar el fármaco y la dosis a cada paciente de forma personalizada por lo que sería un enfoque posible para un futuro estudio. En resumen, en el futuro del TDAH se espera una mejor predicción de tratamiento farmacológico basado en las características genéticas del individuo, no será necesario probar tantos medicamentos diferentes y dosis y además existirán nuevos fármacos que actúen sobre otras vías y más sofisticados, que no produzcan tantos efectos secundarios. Los resultados obtenidos en este estudio, contribuyen a estos avances pero no son concluyentes en la respuesta farmacológica directa.

3.5. RESUMEN VARIABLES ASOCIADAS

La gran cantidad de vías que han mostrado asociación estadísticamente significativa con las distintas variables de estudio confirma la gran heterogeneidad subyacente al diagnóstico de TDAH y del mismo modo, la gran complejidad para el estudio y clasificación de los pacientes diagnosticados con dicho trastorno. En la Tabla 75 se muestran todos los genes/locus que se han asociado en este trabajo con las distintas variables, agrupados según las funciones biológicas en las que están implicados.

Tabla 75.- Tabla resumen que recoge los genes/locus que se han asociado con las distintas variables de estudio (diagnóstico, normalización clínica de los síntomas, subtipo, severidad y comorbilidad), agrupados según su función biológica. Aquéllos locus para los que aun no se ha descubierto su función biológica, se han agrupado al final de la tabla como función "desconocida".

| Vía asociada | Gen/Locus | Variable asociada | | | | | |
|---|-------------|-------------------|-----------|-------------|-------------|--------|---------|
| | | Diagn. | Nom.Clín. | Subt. Inat. | Subt. Comb. | Sever. | Comorb. |
| Metabolismo catecolaminas | MAOB | X | | | | | |
| Serotonina | HTR1B | X | | | | | |
| | TPH2 | X | | X | | | |
| | SLC6A4 | | X | | | | |
| Dopamina | DRD4 | X | | | | | |
| | SLC6A3 | | X | | X | | |
| Adrenalina / Noradrenalina | ADRB2 | X | | | | | |
| | ADRA1A | | X | | | | |
| | DBH | | | | | | X |
| Glutamato | GRIN2A | | | X | | | |
| | GRIK1 | | | X | | | |
| | GRIN2B | | | | | X | |
| | SLC1A3 | | | | X | | |
| Neurotransmisión | SULF2 | | | X | | | |
| | NOS1 | X | | | | | |
| | NEUROD6 | X | | | | | |
| | SNAP25 | | X | | | | |
| Protección SNC por detoxificación | CES1 | X | | | | | |
| Adhesión celular | CDH23 | X | | | | | |
| | ITGAE | | | | X | | |
| Supervivencia y diferenciación neuronal | NTF3 | | | | | | X |
| Crecimiento y división celular | GPC6 | | | | X | | |
| Metabolismo | GFOD1 | | | X | | | |
| Colágeno | ADAMTS2 | | | | | X | |
| Peptidasa membrana interna mitocondrial | IMMP2L | | | | | X | |
| Desconocida | hCG181823_1 | X | | | | | |
| | C10orf79 | X | | | | | |
| | KIAA1486 | | | X | | | |

4. POSIBLES ACCIONES FUTURAS

La continuación lógica de este trabajo sería la de actualizar el chip de genotipado, incluyendo los polimorfismos significativos provenientes del análisis completo de asociación tanto de diagnóstico como los asociados a los fenotipos de TDAH. También se podrían incluir los asociados a respuesta a ATX y MTF descritos en la bibliografía hasta en un futuro poder confirmar o descartar su asociación. Sería interesante incluir todos los polimorfismos que puedan resultar de utilidad en la farmacogenética del TDAH, incluyendo los polimorfismos del CYP2D6, excluyendo al resto (en las Tablas 52 a 58 se muestran los SNPs que sería interesante incluir), y poder utilizar esta herramienta de genotipado en el ámbito clínico para el cálculo de susceptibilidades genéticas de la forma en que se ha descrito en las Tablas 69 a 74, quedando la herramienta abierta a la inclusión de nuevos polimorfismos descritos si se considerara necesario.

Por otro lado, sería interesante también poder realizar una segunda validación clínica de los polimorfismos asociados con una segunda población de pacientes de TDAH de origen también caucásico no relacionada con la primera y poder replicar las asociaciones obtenidas. Para ello las muestras recogidas deberían estar adecuadamente caracterizadas y cumplir los criterios de inclusión. Tras la publicación de la nueva versión del Manual diagnóstico DSM-V sería de gran interés revisar si todos los pacientes siguen cumpliendo criterios diagnósticos de TDAH, eliminando los casos en que no fuera así y repitiendo los análisis de asociación genotipo-fenotipo que fuese necesario.

Incluso se podría llegar a plantear un estudio prospectivo controlado para evaluar la respuesta a tratamiento tanto a ATX como a MTF de forma directa en función del genotipo, en el que se tengan en cuenta las dosis recibidas, periodo del tratamiento y la adherencia al mismo y se discrimine, además, entre aparición de efectos secundarios y no mejoría de los síntomas a la hora de calificar la mala respuesta farmacológica. Además, sería interesante poder incluir nuevas variables de estudio como es, por ejemplo, el genotipo materno, que en la actualidad está en auge como posible predictor del desarrollo de los niños (Johansson et al. 2010).

Una vía de investigación que se podría realizar en paralelo sería la de la búsqueda de novo de marcadores genéticos no descritos previamente en población española. En el desarrollo de este trabajo nos hemos basado en asociaciones previamente descritas en la bibliografía pero sería de gran interés poder realizar análisis de asociación en genes involucrados en vías de reciente asociación con el TDAH, como la división celular o la regulación de la matriz extracelular entre otros.

En rasgos generales, en los próximos años se deben producir avances importantes en la genética del TDAH para identificar y reproducir asociaciones descritas previamente. Esto se deberá fundamentalmente al desarrollo de nuevas tecnologías como la secuenciación a gran escala, que nos permitirá estudiar variantes raras, reordenamientos genómicos y variantes de número de copia (hasta ahora los estudios se han centrado fundamentalmente en SNPs), al avance en métodos de análisis estadísticos, a las mejoras en la definición de los fenotipos del trastorno (con la publicación del DSM-V) y a los esfuerzos colaborativos que se están produciendo entre distintos grupos de investigación para conseguir tamaños muestrales mayores. Cuando estos genes de susceptibilidad a TDAH sean encontrados y confirmados, el siguiente reto será el de buscar mecanismos causales tanto a niveles biológicos como clínicos para poder comprender mejor la patogeneidad del TDAH y lograr el objetivo final de mejorar el diagnóstico y el tratamiento (Stergiakouli y Thapar 2010). Por otro lado, también se espera que se produzcan importantes avances en el campo de los endofenotipos, para buscar asociaciones gen-comportamiento más específicas y sensibles que los síntomas clínicos. Este campo se ha centrado actualmente en respuestas neuropsicológicas y en técnicas de neuroimagen, pero las poblaciones que se han analizado son relativamente pequeñas (Banaschewski et al. 2010)

“Todo está por hacer y todo es posible”

Miquel Pol i Martí (1929-2003)

VI. CONCLUSIONES

1. El empleo de chips de genotipado es de gran utilidad para realizar estudios de asociación de enfermedades psiquiátricas, y más concretamente del TDAH, como se ha demostrado con la realización del estudio piloto. Al mismo tiempo constituyen una potencial herramienta de aplicación clínica para predecir la susceptibilidad genética a TDAH o a ciertos fenotipos asociados al trastorno en población caucásica española, como se ha demostrado con los resultados obtenidos en el estudio completo de asociación, siendo además, una herramienta flexible a la inclusión de nuevos polimorfismos de interés.

2. La elección de la herramienta de genotipado para cada parte del estudio fue determinante en la optimización de los recursos disponibles según el número de muestras y de polimorfismos que se querían genotipar en cada caso, siendo las técnicas de alta capacidad de genotipado las más adecuadas en el caso de muchas muestras y polimorfismos.

3. Actualmente no existe ningún parámetro físico-químico cuantificable que asegure el diagnóstico de TDAH. En el presente estudio se han encontrado 12 polimorfismos pertenecientes a 11 genes diferentes asociados significativamente con el diagnóstico del trastorno en la población caucásica española descrita, apoyando el modelo de herencia multifactorial. Se podría calcular una susceptibilidad genética de padecer TDAH en base a estos polimorfismos que podría ayudar a confirmar el diagnóstico de TDAH puramente clínico en la actualidad.

4. Se han encontrado asociaciones de 20 polimorfismos localizados en 16 genes con los distintos fenotipos de TDAH analizados (normalización clínica de los síntomas, severidad, presencia/ausencia de comorbilidades y los diferentes subtipos). Estos resultados indican que entre los distintos subgrupos de la población de estudio hay diferencias a nivel genético, explicando la gran heterogeneidad en cuanto a la presencia e intensidad de las manifestaciones clínicas y apoyando la teoría de que el diagnóstico de TDAH agrupa a distintos procesos con mecanismos patogénicos próximos pero diferentes. Estas asociaciones podrían utilizarse para indicar susceptibilidades genéticas a determinados fenotipos y tratar a los pacientes de manera personalizada.

5. No se ha encontrado asociación directa entre los polimorfismos analizados y la respuesta a atomoxetina o a metilfenidato. Existen ciertas limitaciones intrínsecas a un estudio de farmacogenética retrospectivo como el que se ha realizado en este trabajo que podrían estar enmascarando los resultados. Debido principalmente a la inexistencia de pacientes *naive*, a la toma de diversos fármacos además de los del estudio, al desconocimiento en cuanto al periodo de tratamiento y adherencia al mismo, a las dosis recibidas en cada caso, o incluso, como ocurre en el caso de la respuesta a la ATX, al bajo número de muestras analizadas. Aun así este tipo de estudios son muy frecuentes en farmacogenética porque aportan mucha información y son más rápidos y económicos que los prospectivos.

VII. GLOSARIO

GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS

Glosario de términos útiles para comprender los estudios de Genética molecular que se nombran en el presente trabajo adaptado de Waldman y Gizer (2006) y abreviaturas utilizadas. La primera vez que se menciona en este trabajo cada una de estas palabras se encuentra señalada en negrita.

| Término | Definición |
|-------------------------|--|
| Alelo | Cada una de las posibles variantes de un polimorfismo. |
| Amplicón | Fragmento que se amplifica en la reacción de PCR. |
| ASO (GoldenGate) | Del inglés <i>Allele-Specific Oligo</i> , cada uno de los dos oligonucleótidos específicos para cada uno de los dos alelos posibles de un SNP en el Ensayo GoldenGate de genotipado. |
| AUC | El área bajo la curva indica la discriminación o precisión del modelo, es decir, el grado en que el modelo distingue entre individuos en los que ocurre el evento y los que no. |
| Curva ROC | Una curva ROC (Característica Operativa del Receptor), es una representación gráfica de la sensibilidad y el complementario de la especificidad (1 – especificidad) de un modelo. |
| Delección (del) | Una o varias bases se eliminan de la secuencia genética. |
| DNA chip | Superficie sólida a la cual se unen una serie de fragmentos de ADN. Se utilizan tanto para genotipado como para análisis de expresión y permiten el análisis simultáneo de muchos genes. También llamado biochip, chip de genotipado o microarray de ADN. |
| DSM-IV-TR | El Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (en inglés Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, DSM) de la Asociación Psiquiátrica de los Estados Unidos (American Psychiatric Association). La edición vigente es la cuarta DSM-IV revisada. |
| Endofenotipo | Marcador subyacente psicológico o biológico que puede ayudar a explicar mejor la acción de los genes en desordenes complejos. |
| Exón | Secuencia de nucleótidos de un gen responsable de codificar para una proteína. |
| Farmacocinética | Rama de la Farmacología que estudia los procesos a los que un fármaco es sometido a través de su paso por el organismo. Trata de dilucidar qué sucede con un fármaco desde el momento en el que es administrado hasta su total eliminación del organismo. |
| Farmacogenética | El estudio de cómo la variabilidad genética afecta a la respuesta a los fármacos en cada individuo. |
| Farmacogenómica | El estudio de la variabilidad en la expresión génica en respuesta a determinados fármacos. |
| Farmacodinamia | Rama de la Farmacología que estudia los efectos bioquímicos y fisiológicos de los fármacos y de sus mecanismos de acción y la relación entre la concentración del fármaco y el efecto de éste sobre un organismo. El estudio de lo que le sucede al organismo por la acción de un fármaco, desde este punto de vista es opuesto a lo que implica la farmacocinética. |

| Término | Definición |
|----------------------------|--|
| Fenotipo conductual | Patrón característico de alteraciones (cognitivas, motoras, sociales y lingüísticas) que se asocian de forma consistente a un trastorno concreto. |
| Gen | Unidad física básica de la herencia. Un gen es una secuencia lineal organizada de nucleótidos en la molécula de ADN (o ARN en el caso de algunos virus), que contiene la información necesaria para la síntesis de una macromolécula con función celular específica, normalmente proteínas, pero también ARNm, ARN ribosómico y ARN de transferencia. Los genes eucariotas están formados por intrones y por exones. La información codificante (la que va a dar lugar a una "proteína") se encuentra solamente en los exones. Los intrones son eliminados durante el proceso de la transcripción y no se conoce su función. |
| GWAS | Estudios de asociación de genoma completo (del inglés <i>Genome Wide Association Study</i>). |
| Heredabilidad | Proporción de varianza atribuible a factores genéticos. |
| Hemicigoto | Un organismo es hemicigoto respecto a una variante específica de un gen cuando posee solamente una copia del mismo. Como los varones sólo poseen un cromosoma X, se afirma que son hemicigotos respecto de los genes localizados en dicho cromosoma. |
| Heterocigoto | Un organismo es heterocigoto respecto a una variante específica de un gen cuando posee dos variantes (alelos) distintas en cada uno de los cromosomas homólogos, cada una heredada de cada uno de los progenitores. |
| Homocigoto | Un organismo es homocigoto respecto a una variante específica de un gen cuando posee dos copias exactas de esa variante una en cada uno de los dos cromosomas homólogos. |
| Inserción (ins) | Una o varias bases se añaden a la secuencia genética. |
| Intrón | Secuencias de nucleótidos de un gen situadas entre los exones y que no codifican proteínas. |
| Kit reordenamientos | Kit de detección de reordenamientos genómicos y VNTRs asociados a TDAH o a una mejor/peor respuesta al tratamiento mediante electroforesis. |
| LD | Análisis de desequilibrio de ligamiento (del inglés <i>Linkage Disequilibrium</i>). |
| LSO (GoldenGate) | Del inglés <i>Locus-Specific Oligo</i> (oligo que hibrida entre 1 y 20 bases hacia 3' del ASO en el Ensayo GoldenGate de genotipado). |
| MTF | Metilfenidato, fármaco psicoestimulante de aplicación en el tratamiento del TDAH. |
| MTF-LI | Metilfenidato de Liberación Inmediata. |
| MTF-LP | Metilfenidato de Liberación Prolongada. |
| NCBI | Centro nacional para la información biotecnológica de EEUU (del inglés <i>National Center for Biotechnology Information</i>). |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>). Técnica de Biología molecular empleada para la amplificación de regiones específicas del ADN. |

Glosario

| Término | Definición |
|--|--|
| PCR multiplex | Reacción en Cadena de la Polimerasa en la que se amplifican varias regiones de DNA diferentes al mismo tiempo (varios amplicones). |
| Polimorfismo | Marcador de ADN que varía entre los individuos de una población. |
| QTL | Locus de un carácter cuantitativo (del inglés <i>Quantitative Trait Locus</i>). Locus cuya variación alélica está asociada con la variación de un carácter cuantitativo, es decir, aquellos caracteres cuantificables que varían de forma continua. |
| R | Indica el número de repeticiones en las VNTRs. |
| Riesgo relativo | Proporción de afectados entre familiares de primer grado de pacientes versus controles. |
| Secuencias repetidas (STRs y VNTRs) | Marcadores de ADN que consisten en un número de pares de bases que se repiten en un número variable de veces entre los distintos individuos de una población. Si la repetición es de 2 ó 3 pares de bases se les llama STRs (repeticiones cortas en tándem), si la repetición abarca entre 10 y 40 pb se conocen como VNTRs (repeticiones en tándem de número variable). |
| SNP | Polimorfismo de cambio de nucleótido (del inglés <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>). |

Glosario de abreviaturas de los genes y loci que se han analizado en este trabajo.

| Abreviatura | Nombre del gen |
|-----------------|---|
| ADAMTS2 | Desintegrina y metaloproteínasa (Procolágeno I N-proteínasa) |
| ADRA1A | Adrenoceptor subunidad α 1A |
| ADRA2A | Adrenoceptor subunidad α 2A |
| ADRB2 | Adrenoceptor subunidad β 2 |
| AR | Receptor de andrógenos |
| ARRB2 | Arrestina β 2 |
| ASTN2 | Astrotactina 2 |
| ATP2C2 | ATPasa transportadora de calcio, tipo 2C, miembro 2 |
| BDNFOS | Hebra opuesta del Factor neurotrófico derivado de cerebro (región no codificante de proteína) |
| C10orf79 | Marco de lectura abierto 79 en el cromosoma 10 |
| C21orf33 | Marco de lectura abierto 33 en el cromosoma 21 |
| C3orf21 | Marco de lectura abierto 21 en el cromosoma 3 |
| C9orf98 | Marco de lectura abierto 98 en el cromosoma 9 |
| CACNA1F | Subunidad α 1F, tipo L, de canal de calcio, voltaje dependiente |
| CDH13 | Cadherina 13, H cadherina |
| CES1 | Carboxil esterasa 1 |
| CHRNA4 | Receptor nicotínico de acetilcolina subunidad α 4 |
| CLOCK | Proteína implicada en los ritmos circadianos locomotores |
| CNR1 | Receptor canabinoide CB1 (cerebral) |
| CNTFR | Receptor de factor neurotrófico ciliar |
| CNTNAP4 | Similar a proteína asociada a contactina |

Glosario

| Abreviatura | Nombre del gen |
|-------------|---|
| COMT | Catecol-O-metiltransferasa |
| CREB5 | Proteína 5 responsable de unión a AMPc |
| CRYGC | Cristalina γ C |
| CSMD2 | Proteína 2 del dominio CUB y sushi |
| CTNNA2 | Catenina α 2 (proteína asociada a cadherina) |
| DBH | Dopamina β hidroxilasa |
| DCLK1 | Kinasa 1 similar a doblecortina |
| DDC | Dopa decarboxilasa |
| DMRT2 | Factor de transcripción 2 relacionado con "doblexo" y mab-3 |
| DNM1 | Dinamina 1 |
| DRD1 | Receptor D1 de dopamina |
| DRD4 | Receptor D4 de dopamina |
| DRD5 | Receptor D5 de dopamina |
| DSC3 | Desmocolina 3 |
| DSEL | Epimerasa similar a dematan sulfato |
| EREG | Epiregulina |
| FADS1 | Desaturasa 1 de Ácidos Grasos |
| FADS2 | Desaturasa 2 de Ácidos Grasos |
| FHIT | <i>Fragile histidine triad gene</i> (gen supresor de tumores) |
| FLJ43390 | Hipotético LOC646113 |
| FOXP1 | Caja P1 "forkhead" |
| GFOD1 | Proteína que contiene el dominio 1 de la oxidoreductasa glucosa-fructosa |
| GPC6 | Glipicano 6 |
| GRIK1 | Subunidad 1 del receptor ionotrópico de glutamato (GluK1) |
| GRIN2A | Subunidad 2A del receptor ionotrópico de glutamato (GluN2A) |
| GRIN2B | Subunidad 2B del receptor ionotrópico de glutamato (GluN2B) |
| hCG_1818231 | LOC728978, desconocido |
| hCG_2045614 | LOC646179, desconocido |
| HTR1B | Receptor 1B de serotonina |
| HTR2A | Receptor 1A de serotonina |
| IL16 | Interleukina 16 (factor quimioatrayente linfocitario) |
| IMMP2L | Similar a peptidasas de la membrana interna mitocondrial IMP2 |
| ITGA11 | Integrina α 11 |
| ITGAE | Integrina α E (antígeno CD103, antígeno 1 de linfocitos de mucosa humana, polipéptido α) |
| ITPR2 | Receptor tipo 2 de inositol 1, 4, 5-trifosfato |
| KCNC1 | Canal voltaje dependiente de potasio, subfamilia Shaw, miembro 1 |
| KCNIP1 | Proteína 1 moduladora de canal de potasio |
| KCNIP4 | Proteína 4 moduladora de canal de potasio |
| KIAA1486 | Proteína hipotética LOC52624 |
| LOC128322 | Similar al factor de transporte nuclear 2 |
| LOC389101 | Pseudogen 43 de la proteína ribosomal L23a |

Glosario

| Abreviatura | Nombre del gen |
|----------------|---|
| LOC390641 | Similar a selenofosfato sintetasa |
| LOC393078 | Locus hipotético 393078 |
| LOC441996 | Pseudogen mitocondrial aconitasa 2 |
| LOC728073 | Proteína hipotética LOC728073 |
| LOC728594 | Proteína hipotética LOC728594 |
| LOC729293 | Pseudogen 10 de la proteína ribosómica S18 |
| LOC729628 | Proteína similar a hornerina |
| LOC729825 | Proteína hipotética LOC29825 |
| LOC729980 | Locus hipotético 29980 |
| LPCAT1 | Lipofosfatidilcolina aciltransferasa 1 |
| LPHN3 | Latrofilina 3 (receptor acoplado a proteína G) |
| LPL | Lipoproteín lipasa |
| MAN2A2 | Manosidasa α , clase 2 ^a , miembro 2 |
| MAOA | Monoamino oxidasa A |
| MAOB | Monoamino oxidasa B |
| MAP1B | Proteína 1B asociada a microtúbulo |
| MAP3K7 | Proteín quinasa quinasa quinasa 7 activada por mitógeno |
| MBOAT1 | Proteína 1 del dominio O-aciltransferasa unido a membrana |
| MEIS2 | Meis homeobox 2 |
| MGC33657/PCDP1 | Proteína 1 de disquinesia ciliar primaria |
| MGC48628 | Miembro A de la familia 190 con similitud en secuencia (proteína función desconocida) |
| MMP24 | Metalopeptidasa 24 (integrada en la membrana) |
| MOBP | Proteína básica oligodendroctaria asociada a mielina |
| MYT1L | Similar a factor de transcripción 1 mielínico |
| NAP5 | Proteína 5 asociada a NCK (proteína clock 2 periférica) |
| NAPRT1 | Nicotinato fosforibosiltransferasa proteína 1 |
| NAV2 | Navegador neuronal 2 |
| NEDD4L | Precursor neural expresado en células |
| NEUROD6 | Factor de diferenciación neurogénica 6 |
| NGFB | Factor de crecimiento del nervio (factor β) |
| NOS1 | Óxido nítrico sintasa 1 (neuronal) |
| NRG3 | Neurregulina 3 |
| NT5DC3 | Proteína 3 que contiene un dominio 5'-nucleosidasa |
| NTF3 | Neurotrofina 3 |
| NTRK2 | Receptor tipo 2, tirosinquinasa neurotrófico |
| NUCB1 | Nucleobindina 1 |
| OXER1 | Receptor 1 oxoeicosanoide (OXE) |
| PNMT | Fosfatidiletanolamina- N- metiltransferasa |
| PPM1F | Proteín fosfatasa dependiente de Magnesio y Manganeso, 1F |
| PTHLH | Homona similar a homona paratiroidea |
| PTPRD | Receptor tipo D, proteín tirosín fosfatasa |

Glosario

| Abreviatura | Nombre del gen |
|--------------------|---|
| RAB27B | Miembro RAS de familia de oncogenes |
| REEP5 | Proteína 5 de receptor accesorio |
| RORA | Receptor A relacionado con –RAR (retinoideo) |
| SH3BGR2 | Similar a proteína rica en ácido glutámico 2 de unión a dominios SH3 |
| SLC1A1 | Transportador de glutamato, sistema Xag, de alta afinidad neuronal/epitelial |
| SLC1A3 | Transportador de glutamato de alta afinidad glial |
| SLC6A2 | Transportador de noradrenalina (NET) |
| SLC6A3/DAT1 | Transportador de dopamina (DAT1) |
| SLC6A4 | Transportador de serotonina (SERT) |
| SLC9A9 | Transportador de solutos, familia 9 miembro9, intercambiador sodio/hidrógeno |
| SLCO3A1 | Miembro 3A1 de la familia de transportadores de solutos de aniones orgánicos |
| SNAP25 | Proteína asociada al sinaptosoma (25 KDa) |
| SNX9 | Nexina 9 “sorting” |
| STS | Sulfatasa esteroidea microsomal, isoenzima S |
| SULF2 | Sulfatasa 2 |
| SUPT3H | Proteína iniciadora de la transcripción homóloga a SPT3 |
| SYP | Sinaptosina |
| SYT1 | Sinaptogamina 1 |
| TACR1 | Receptor tipo 1 de taquiquinina |
| TFEB | Factor de transcripción EB |
| TGFB2 | Factor de crecimiento transformante β 2 |
| TLL2 | Proteína 2 similar a toloide |
| TPH2 | Triptófano hidroxilasa 2 |
| TRPS1 | Proteína tipo 1 del síndrome trico-rino-falangeal (proteína tipo dedos de zinc) |
| ZNF544 | Proteína dedos de zinc 544 |
| ZNF805 | Proteína dedos de zinc 805 |

VIII. ANEXOS

ANEXO I

| | | | |
|---|--|---------|--------------|
|  | CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS | Centro: | |
| | | Código: | 2007PGK-TDAH |

Estudio clínico multicéntrico de investigación para el desarrollo de un sistema no invasivo *in Vitro* (DNA-CHIP de genotipado) para el pronóstico y predicción de respuesta a tratamiento del trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH)

PROMOTOR: PROGENIKA BIOPHARMA S.A.
 Parque tecnológico de Bizkaia, Edificio 504
 48160-Derio
 Tel: 944 064 525; Fax: 944 064 526
info@progenika.com; www.progenika.com

VERSIÓN: Mayo de 2008

| | | | |
|-----------------------|---|--|---|
| PACIENTE | | | |
| Código: | TDAH- | <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> | - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> |
| | | Nº hospital = Código Postal | Nºpaciente (correlativo) |
| Objetivo Primario → | <input type="checkbox"/> Mala evolución | <input type="checkbox"/> Buena evolución | |
| Objetivo Secundario → | <input type="checkbox"/> Mala respuesta | <input type="checkbox"/> Buena respuesta | <input type="checkbox"/> No participa en este objetivo |

| | | | |
|----------------|---------------|---|--|
| MUESTRA | | | |
| Obtenida por: | Investigador: | <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> | Fecha: <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> |
| | | Iniciales | d d / m m / a a |
| Recibida por: | Investigador: | <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> | Fecha: <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> |
| | | Iniciales | d d / m m / a a |

| | | | |
|---|--|---------|--------------|
|  | CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS | Centro: | |
| | | Código: | 2007PGK-TDAH |

CONTENIDO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INCLUSIÓN | 3 |
| 2 | TEST | 4 |
| 2.1 | Test ADHD Rating Scale-IV-versión del padre (menores de edad)..... | 4 |
| 2.2 | Test ADHD Rating Scale versión autoaplicada y para el paciente (mayores de edad) . | 5 |
| 2.3 | Escala de Impresión Clínica Global..... | 6 |
| 2.4 | Otros test realizados | 6 |
| 3 | COMENTARIOS | 8 |
| 4 | ANEXO 1: TEST | 10 |
| 4.1 | Test ADHD Rating Scale-IV-versión del padre (menores de edad) | 10 |
| 4.2 | Test ADHD Rating Scale versión autoaplicada y para el paciente (mayores de edad) 11 | |

INSTRUCCIONES

• **INSTRUCCIONES PARA EL MANEJO DE MUESTRAS**

La muestra de saliva se tomará en la consulta en los botes del kit Oragene™ proporcionados por Progenika.

El bote se etiquetará con los siguientes datos:

- código del estudio.....2007PGK-TDAH
- fecha de obtención de la muestra:.....dd/mm/aa
- nº de centro – nº de pacientexxx-yyy

Las muestras una vez recogidas y correctamente etiquetadas se almacenarán a temperatura ambiente hasta su envío a Progenika. El periodo entre la recogida y el envío de la muestra no debe ser superior a siete/ocho días..

Cuando el número de muestras sea adecuado, un servicio de mensajería, contratado por la empresa promotora, transportará las muestras desde el centro de recogida hasta los laboratorios de análisis.

• **INSTRUCCIONES PARA COMPLETAR ESTE CUADERNO**

1) Al iniciar cada hoja, completar el encabezado (INVESTIGADOR, PACIENTE, FECHA).

- Identificación del paciente: número consecutivo.
- Identificación del investigador: iniciales y firma de quien completa cada hoja.
- Fecha: fecha en que se completa cada hoja.

2) Si es necesario hacer algún comentario no previsto en el CRD, hágalo en la hoja final reservada para ello.

3) **Datos numéricos**: Los datos numéricos deben ser escritos comenzando por la izquierda, rellenando con ceros siempre que sea necesario.

Ejemplo: **Correcto**

| | | |
|---|---|---|
| 0 | 7 | 5 |
|---|---|---|

Incorrecto:

| | | |
|---|---|--|
| 7 | 5 | |
|---|---|--|

4) **Correcciones**: Para cualquier corrección necesaria, debe cruzarse con una línea el dato incorrecto y a continuación escribir el dato correcto añadiendo la fecha de la corrección y la firma de quien la hace. **NO utilizar fluido corrector ni tachar.**

Ejemplo: 0 7 5 Firma dd/mm/aa

| | | |
|--------------|--------------|--|
| 7 | 5 | |
|--------------|--------------|--|

5) **Correcciones**: Para cualquier corrección necesaria, debe cruzarse con una línea el dato incorrecto y a continuación escribir el dato correcto añadiendo la fecha de la corrección y la firma de quien la hace. **NO utilizar fluido corrector ni tachar.**

Ejemplo:

| | | |
|--------------|--------------|--|
| 7 | 5 | |
|--------------|--------------|--|

 0 7 5 Firma dd/mm/aa

• **DESARROLLO DEL PROYECTO**

El proyecto consistirá en una sola visita en la que el investigador explicará al paciente el proyecto. Una vez aceptado y firmado el consentimiento informado se procederá a pasar los tests correspondientes (ADHD-RS versión del padre y la escala de Impresión clínica Global) y a la donación de una muestra de saliva por parte del paciente. Dicha muestra se trasladará a las instalaciones del promotor para su posterior evaluación.

| | | | |
|---|--------------------------------------|---------|--------------|
|  | CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS | Centro: | |
| | | Código: | 2007PGK-TDAH |

| | | |
|--------------------|--|---|
| 1 INCLUSIÓN | Paciente nº: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> | Iniciales: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> |
| | Fecha: <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> | Investigador: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> |

Criterios de inclusión

| | | |
|---|----|----|
| 1. Paciente (masculino o femenino) y de origen caucásico | SI | NO |
| 2. Consentimiento informado por escrito | SI | NO |
| 3. Diagnóstico de TDAH según los criterios de inclusión descritos en el manual DMS-IV | SI | NO |
| 4. Diagnóstico de TDAH realizado al mínimo, a partir de los siete años | SI | NO |
| 5. Periodo de evolución de más de DOS años desde el momento del diagnóstico | SI | NO |

Para continuar, todas las respuestas deben ser sí

Fecha de nacimiento: / /

Sexo

| | |
|--------------------------------------|-------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> 1 Masculino | <input type="checkbox"/> 2 Femenino |
|--------------------------------------|-------------------------------------|

Diagnóstico de TDAH

| | | | | | |
|----------|--|---|----------|-----------------------|-----------|
| 1 | Fecha del primer diagnóstico de TDAH | <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> | | | |
| 2 | Puntuación obtenida en el test ADHD-RS-versión padre (para menores de edad) | <input type="text"/> <input type="text"/> | | | |
| 3 | Puntuación obtenida en el test ADHD-RS-versión autoaplicada (para mayores de edad) | <input type="text"/> <input type="text"/> | | | |
| 4 | Puntuación obtenida con la escala ICG | <input type="text"/> | | | |
| 5 | Subtipo de TDAH (marcar el que corresponda): | <table border="1"> <tr> <td>Inatento</td> <td>Hiperactivo/impulsivo</td> <td>Combinado</td> </tr> </table> | Inatento | Hiperactivo/impulsivo | Combinado |
| Inatento | Hiperactivo/impulsivo | Combinado | | | |

Antecedentes

| | |
|---|--|
| 1 | Familiares (Maltrato, centro de acogida, etc.) |
| 2 | Sociales (Abuso de sustancias, etc.) |
| 3 | Escolares (Fracaso, expulsión, etc.) |
| 4 | Otro:..... |

Tratamientos recibidos

| | Nombre | Fecha de Inicio (mes / año) | Fecha fin (mes / año) |
|---|---------|---|---|
| 0 | Ninguno | | |
| 1 | | <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> | <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> |
| 2 | | <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> | <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> |
| 3 | | <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> | <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> |
| 4 | | <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> | <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> |

| | | | |
|---|--|---------|--------------|
|  | CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS | Centro: | |
| | | Código: | 2007PGK-TDAH |

| | | |
|--|---|--|
| 2 TEST | Paciente nº: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> | Iniciales: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> |
| Fecha: <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> | Investigador: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> | Firma: |

2.1 Test ADHD Rating Scale-IV-versión del padre (menores de edad)

Por favor, CIRCULE el número que mejor describa el comportamiento de su hijo durante los últimos 6 meses:

| | Nunca o rara vez | Algunas veces | Con frecuencia | Con mucha frecuencia |
|---|------------------|---------------|----------------|----------------------|
| 1. No presta mucha atención a detalles o comete errores por descuido, en tareas escolares | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 2. Juega con manos o los pies o se retuerce en su silla | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 3. Tiene dificultades en mantener la atención en tareas o actividades de juego | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 4. Abandona su asiento en la clase o en otras situaciones en que deba permanecer sentado | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 5. No parece escuchar cuando se le habla directamente | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 6. Corretea o trepa excesivamente en situaciones en que es inapropiado | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 7. No sigue por completo las instrucciones y falla en terminar el trabajo | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 8. Tiene dificultad jugando o participando en actividades de diversión en forma callada | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 9. Tiene dificultad organizando las tareas y actividades | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 10. Está "siempre en movimiento" o actúa como si estuviese "movido por un motor" | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 11. Evita tareas (ej: en la escuela o en casa) que requieren un esfuerzo sostenido | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 12. Habla excesivamente | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 13. Pierde cosas necesarias para sus actividades o tareas | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 14. Da respuestas a tontas y a locas antes de que las preguntas sean completadas | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 15. Se distrae fácilmente | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 16. Tiene dificultades esperando turno | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 17. Es olvidadizo en sus actividades diarias | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 18. Se entromete o interrumpe a otros | 0 | 1 | 2 | 3 |

TOTAL: ____ (una puntuación superior o igual a 18 implicaría mala evolución, mientras que una puntuación inferior a 18 implicaría buena evolución)

| | | | |
|---|--|---------|--------------|
|  | CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS | Centro: | |
| | | Código: | 2007PGK-TDAH |

2.2 Test ADHD Rating Scale versión autoaplicada y para el paciente (mayores de edad)

Por favor, CIRCULE el número que mejor describa su comportamiento durante los últimos pasados 6 meses:

| | Nunca o rara vez | Algunas veces | Con frecuencia | Con mucha frecuencia |
|--|------------------|---------------|----------------|----------------------|
| 1. Al hacer mi trabajo no logro fijar la atención en detalles o cometo errores por no tener cuidado | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 2. Meneo las manos o los pies o me muevo constantemente en mi asiento | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 3. Tengo dificultad para sostener mi atención en las tareas o en las actividades de diversión | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 4. Me levanto del asiento en situaciones en donde se espera que permanezca sentado | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 5. No presto atención cuando se me habla directamente | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 6. Me siento inquieto | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 7. No sigo instrucciones de principio a fin y no termino el trabajo asignado | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 8. Tengo dificultades para llevar a cabo actividades en mi tiempo libre de manera calmada o para hacer cosas divertidas tranquilamente | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 9. Tengo dificultad para organizar las tareas y actividades | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 10. Me siento como si tuviese que "moverme continuamente" o "como si me empujara un motor" | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 11. Me disgusta, evito o estoy reticente a llevar a cabo trabajo que requiera esfuerzo mental sostenido | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 12. Hablo en exceso | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 13. Pierdo cosas que son necesarias para llevar a cabo trabajo tareas o actividades | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 14. Contesto abruptamente antes de que otros terminen de hacerme las preguntas | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 15. Me distraigo fácilmente | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 16. Tengo dificultad para esperar mi turno | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 17. Soy olvidadizo en las actividades diarias | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 18. Interrumpo a los demás o soy entrometido | 0 | 1 | 2 | 3 |

TOTAL: ____ (una puntuación superior o igual a 18 implicaría mala evolución, mientras que una puntuación inferior a 18 implicaría buena evolución)

| | | | |
|---|--|---------|--------------|
|  | CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS | Centro: | |
| | | Código: | 2007PGK-TDAH |

2.3 Escala de Impresión Clínica Global

Comparado con el estado inicial, ¿cómo se encuentra el paciente en estos momentos? Puntúe la mejoría total independientemente de que a su juicio se deba o no por completo al tratamiento. (Por favor **MARQUE** el número que mejor describa el estado actual del paciente)

| | |
|---|---------------------|
| 0 | No evaluado |
| 1 | Mucho mejor |
| 2 | Moderadamente mejor |
| 3 | Levemente mejor |
| 4 | Sin cambio |
| 5 | Levemente peor |
| 6 | Moderadamente peor |
| 7 | Mucho peor |

TOTAL: ____

(Puntuación mayor o igual a 3 durante al menos 3 a 6 meses se considerará mala respuesta, sin embargo una puntuación inferior o igual a 2 durante al menos 3 a 6 meses se considerará buena respuesta al tratamiento)

2.4 Otros test realizados

Se pide indicar las puntuaciones obtenidas para la evaluación de la sintomatología del TDAH en el momento del diagnóstico ya sea, calculado por el test correspondiente en el mismo momento del diagnóstico o, estimado de manera retrospectiva con el ADHD-RS-IV en el momento actual (Anexo 1):

| | Nombre | Valor en el momento del diagnóstico | Indicar si el valor obtenido en el momento del diagnóstico es el REAL o es ESTIMADO por los padres retrospectivamente | | Fecha realización si no coincide con el momento del diagnóstico (mes/año) | Valor actual (si lo hubiera) | Fecha realización si no coincide con el de la muestra (mes/año) |
|---|----------------------------------|---|---|----------|---|---|---|
| 0 | Ninguno | ----- | ----- | | ----- | ----- | ----- |
| 1 | ADHD RS-IV | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | Real | Estimado | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | ----- | ----- |
| 2 | ICG | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | Real | Estimado | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | ----- | ----- |
| 3 | Conner's RS (18 primeros ítems)* | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | Real | Estimado | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> |
| 4 | SNAP | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | Real | Estimado | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> |
| 5 | Otros:..... | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | Real | Estimado | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> |

*Nota: Para el test de Conner's: a) puntuación de los ítems del 1 al 9 (inatención)
 b) puntuación de los ítems del 10 al 18 (hiperactividad)

| | | | |
|---|--|---------|--------------|
|  | CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS | Centro: | |
| | | Código: | 2007PGK-TDAH |

A De acuerdo con los anteriores resultados, el paciente se clasifica para el Objetivo Primario como:

| | |
|---|--------------------------|
| 1 | Buena Evolución del TDAH |
| 2 | Mala Evolución del TDAH |

Comorbilidades

| | |
|---|-----------------------------------|
| 1 | Trastorno Negativista Desafiante |
| 2 | Trastorno Disocial |
| 3 | Trastorno de Ansiedad |
| 4 | Trastorno Afectivo |
| 5 | Trastorno del aprendizaje escolar |
| 6 | Otros:..... |

B De acuerdo con los anteriores resultados, el paciente se clasifica para el Objetivo Secundario como:

| | |
|---|----------------------------|
| 1 | Buena Respuesta a Fármacos |
| 2 | Mala Respuesta a Fármacos |
| 3 | No participa |

OBTENER MUESTRA DE SALIVA PARA GENÓMICA Y CODIFICAR EN PORTADA

2007PGK-TDAH-a2bCRD-080513_Reus.docx7
7

| | | | |
|---|--|---------|--------------|
|  | CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS | Centro: | |
| | | Código: | 2007PGK-TDAH |

4 ANEXO 1

En caso que no se tenga la cuantificación de la sintomatología en el momento del diagnóstico se pide que se calcule la sintomatología inicial del TDAH de manera retrospectiva utilizando los siguientes test correspondientes al ADHD-Rating Scale-IV:

| | | |
|---|--|---------------------------------------|
|  | CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS | Centro: _____ Código: 2007PGK-TDAH |
|---|--|---------------------------------------|

| | | | |
|--|---|--|--|
| 4.1 TEST: RETROSPECTIVO | Paciente nº: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> | Iniciales: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> | |
| Fecha: <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> / <input type="text"/> <input type="text"/> | Investigador: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> | Firma: _____ | |

4.1.1 Test ADHD Rating Scale-IV-versión del padre (menores de edad) (Retrospectivo)

Por favor, CIRCULE el número que mejor describa el comportamiento de su hijo/a cuando fue diagnosticado con TDAH:

| | Nunca o rara vez | Algunas veces | Con frecuencia | Con mucha frecuencia |
|---|------------------|---------------|----------------|----------------------|
| 1. No prestaba mucha atención a detalles o cometía errores por descuido en tareas escolares | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 2. Jugaba con manos o con los pies o se retorcía en su silla | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 3. Tenía dificultades en mantener la atención en tareas o actividades de juego | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 4. Abandonaba su asiento en la clase o en otras situaciones en que debía permanecer sentado | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 5. No parecía escuchar cuando se le hablaba directamente | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 6. Correteaba o trepaba excesivamente en situaciones en que era inapropiado | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 7. No seguía por completo las instrucciones y fallaba en terminar el trabajo | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 8. Tenía dificultad jugando o participando en actividades de diversión en forma callada | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 9. Tenía dificultad organizando las tareas y actividades | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 10. Estaba "siempre en movimiento" o actuaba como si estuviese "movido por un motor" | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 11. Evitaba tareas (ej: en la escuela o en casa) que requerían un esfuerzo sostenido | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 12. Hablaba excesivamente | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 13. Perdía cosas necesarias para sus actividades o tareas | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 14. Daba respuestas a tontas y a locas antes de que las preguntas fueran completadas | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 15. Se distraía fácilmente | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 16. Tenía dificultades esperando turno | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 17. Era olvidadizo en sus actividades diarias | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 18. Se entrometía o interrumpía a otros | 0 | 1 | 2 | 3 |

TOTAL: ____ (una puntuación superior o igual a 18 implicaría mala evolución, mientras que una puntuación inferior a 18 implicaría buena evolución)

2007PGK-TDAH-a2bCRD-080513_Reus.docx7 10

| | | | |
|---|--|---------|--------------|
|  | CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS | Centro: | |
| | | Código: | 2007PGK-TDAH |

4.1.2 Test ADHD Rating Scale versión autoaplicada y para el paciente (mayores de edad) (Retrospectivo)

Por favor, CIRCULE el número que mejor describa su comportamiento cuando fue diagnosticado de TDAH:

| | Nunca o rara vez | Algunas veces | Con frecuencia | Con mucha frecuencia |
|--|------------------|---------------|----------------|----------------------|
| 1. Al hacer mi trabajo no lograba fijar la atención en detalles o cometía errores por no tener cuidado | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 2. Meneaba las manos o los pies o me movía constantemente en mi asiento | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 3. Tenía dificultad para sostener mi atención en las tareas o en las actividades de diversión | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 4. Me levantaba del asiento en situaciones en donde se esperaba que permaneciera sentado | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 5. No prestaba atención cuando se me hablaba directamente | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 6. Me sentía inquieto | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 7. No seguía instrucciones de principio a fin y no terminaba el trabajo asignado | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 8. Tenía dificultades para llevar a cabo actividades en mi tiempo libre de manera calmada o para hacer cosas divertidas tranquilamente | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 9. Tenía dificultad para organizar las tareas y actividades | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 10. Me sentía como si tuviese que "moverme continuamente" o "como si me empujara un motor" | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 11. Me disgustaba, evitaba o estaba reticente a llevar a cabo trabajo que requería esfuerzo mental sostenido | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 12. Hablaba en exceso | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 13. Perdía cosas que eran necesarias para llevar a cabo trabajo tareas o actividades | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 14. Contestaba abruptamente antes de que otros terminaban de hacerme las preguntas | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 15. Me distraía fácilmente | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 16. Tenía dificultad para esperar mi turno | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 17. Era olvidadizo en las actividades diarias | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 18. Interrumpía a los demás o era entrometido | 0 | 1 | 2 | 3 |

TOTAL: ____ (una puntuación superior o igual a 18 implicaría mala evolución, mientras que una puntuación inferior a 18 implicaría buena evolución)

ANEXO II

| | | |
|--|---|----------------------|
|  | HOJA DE INFORMACIÓN AL SUJETO CONSENTIMIENTO INFORMADO | Centro: |
| | | Código: 2007PGK-TDAH |
| ESTUDIO: | Estudio clínico multicéntrico de investigación para el desarrollo de un sistema no invasivo <i>in Vitro</i> (DNA-CHIP de genotipado) para el pronóstico y predicción de respuesta a tratamiento del trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) | |
| PROMOTOR: | PROGENIKA BIOPHARMA S.A. Parque tecnológico de Bizkaia, Edificio 801-B, 48160-Derio Tel: 944 064 525; Fax: 944 064 526 info@progenika.com ; www.progenika.com | |
| INVESTIGADOR: | Dra: Servicio de Teléf: | e-mail: |
| 1 <u>INFORMACIÓN AL SUJETO PARTICIPANTE EN UN ESTUDIO</u> | | |
| 1.1 <u>INFORMACIÓN GENERAL</u> | | |
| <p>Nos dirigimos a usted como padre y/o representante legal de un paciente menor de edad diagnosticado de trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), para informarle e invitarle a participar en un estudio de investigación (arriba mencionado) que se está llevando a cabo en este hospital bajo la supervisión del arriba mencionado investigador principal. El estudio ha sido ya revisado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) de este hospital.</p> <p>La colaboración que le solicitaremos es muy sencilla (simplemente que su hijo y/o representado nos dé una muestra de saliva), pero antes de hacer nada, necesitamos su consentimiento libre y voluntario. Por eso queremos proporcionarle la información correcta y suficiente para que pueda valorar si quiere o no participar en el estudio. Para ello <u>lea esta hoja informativa con atención</u> y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir.</p> <p>Su decisión acerca de participar o no en el proyecto no afectará a la atención médica que le proporcionen sus médicos.</p> | | |
| 1.2 <u>OBJETIVO DEL ESTUDIO</u> | | |
| <p>Las enfermedades evolucionan de una manera diferente en cada paciente. Concretamente, en el TDAH hay pacientes que tienen una mejor evolución que otros, que presentan con los años otros síntomas asociados. Sería de utilidad, para adaptar el tratamiento a cada paciente, identificar desde el momento inicial del diagnóstico aquellos pacientes que vayan a evolucionar peor. Esta diferente respuesta se ha asociado a los genes de cada paciente y, en ocasiones esta mala evolución puede estar también asociada a una mala respuesta al tratamiento.</p> <p>El objetivo del estudio es evaluar clínicamente si una nueva prueba genética sirve para diferenciar a los pacientes con TDAH que van a tener buena evolución de los que van a tener mala. Si el resultado del estudio fuera bueno, la prueba sería de gran utilidad para el</p> | | |
| <hr/> <small>CONSENTIMIENTO.docx</small> | | |
| 1 de 8 | | |

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | HOJA DE INFORMACIÓN AL SUJETO CONSENTIMIENTO INFORMADO | Centro: |
| | | Código: 2007PGK-TDAH |

seguimiento de estos pacientes, puesto que se trata de una prueba fácil de realizar (basta con una muestra de saliva) y se podría hacer incluso en niños pequeños.

Por lo tanto, le pedimos su consentimiento para utilizar la muestra de saliva obtenida de su hijo o representado para investigar estas diferencias genéticas (propias de cada persona) y relacionarlas con los datos de su enfermedad, de tal forma que podamos ver si algunos genes están relacionados con la evolución (buena o mala) de la enfermedad.

Concretamente, en este estudio se van a estudiar 85 variedades presentes en 27 genes que se han relacionado previamente tanto con la enfermedad como con su tratamiento.

Es importante que conozca que la identidad del paciente va a permanecer en anonimato y no se va a poder asociar con la información genética obtenida.

Otros objetivos

Además y de forma independiente al objetivo anterior, le vamos a pedir consentimiento para otras tres cosas:

- Para cumplimentar los test necesarios para evaluar el estatus clínico de su hijo/a o representado. Estos tests serían para menores de edad el Test ADHD Rating Scale versión padre o para mayores de edad el Test ADHD Rating Scale versión autoaplicada y para el paciente (para estudiar la evolución de la enfermedad) y la Escala de Impresión Clínica Global (para estudiar la respuesta al tratamiento).

- Para poder conservar la muestra y si en el futuro aparecen nuevos genes relacionados con la enfermedad (TDAH) o su tratamiento, poder estudiarlos. Previamente a cualquier nuevo estudio, el promotor deberá obtener la aprobación de un comité ético de investigación clínica.

Es importante que comprenda que nos puede dar consentimiento para el primer uso de la muestra y no darlo para alguno de los otros dos. El rechazo a estos otros objetivos no implica no participar en el estudio.

1.3 METODO DE OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

Para estudiar esos genes necesitamos una muestra de ADN. En este estudio, el ADN se va a obtener a partir de una muestra de saliva, y esta será la única muestra que se le pida a su hijo o representado. Para ello, se recogerá una muestra de saliva en un pequeño recipiente que conservará el ADN hasta su análisis. Por supuesto, esta forma de obtención de la muestra es indolora y no conlleva ningún riesgo.

A continuación ese bote se codificará con un código para mantener el anonimato del paciente y la confidencialidad de sus datos (no se escribirá en ese bote ningún dato que permita identificarle) y será enviado al laboratorio donde se analizará, junto a los datos de la enfermedad (básicamente, el tipo de enfermedad y su evolución) también de forma codificada y confidencial.

Una vez acabado el estudio, la muestra bien se destruirá (si no nos da su consentimiento para otros estudios posteriores) o bien se conservará para estudios posteriores (si nos da su consentimiento).

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | HOJA DE INFORMACIÓN AL SUJETO CONSENTIMIENTO INFORMADO | Centro: |
| | | Código: 2007PGK-TDAH |

El equipo investigador estará integrado por miembros del servicio de psiquiatría del Hospital que le trata. El lugar de realización del análisis serán las instalaciones de la empresa Progenika Biopharma SA situadas en el Parque Tecnológico Bizkaia.

1.4 RIESGOS Y MOLESTIAS

Como se trata de una muestra saliva, su obtención no supone ningún riesgo para el paciente y las molestias son mínimas (depositar saliva en un pequeño bote).

Por participar en el estudio no tiene que volver para otras visitas ni sufrir otros procedimientos extraordinarios. Su visita sólo durará unos minutos más (los necesarios para otorgar el consentimiento y obtener la muestra de saliva). Una vez finalizada esta visita, habrá concluido su participación en el proyecto y no se exigirá que dedique ningún tiempo adicional al mismo.

1.5 VOLUNTARIEDAD DE LA PARTICIPACIÓN Y DERECHO DE REVOCACIÓN

Recuerde que no tienen ninguna obligación de participar en este estudio, y si así lo desea, su decisión no repercutirá en los cuidados médicos de su hijo o representado. Recordarle también que no recibirá ningún tipo de compensación económica por participar en este proyecto.

Como ya se ha explicado anteriormente, la participación en el estudio se basa únicamente en proporcionar una muestra de saliva para el mismo. Pero si posteriormente se arrepiente, puede revocar este consentimiento cuando quiera, sin tener que dar explicaciones sobre sus razones y, por supuesto, sin que este hecho vaya a repercutir en su atención y cuidado médico.

1.6 CONFIDENCIALIDAD

La identidad de su hijo o representado será disociada de la muestra mediante la adjudicación de un código por lo que la información de la muestra siempre estará disociada de la información personal. El acceso a la información personal queda restringido a los médicos del estudio y colaboradores (en su caso, el monitor del estudio) y al Comité Ético de Investigación Clínica que evalúa el estudio. Como ya se ha descrito, se adoptarán estrictas medidas de seguridad para garantizar el anonimato de los resultados genéticos. La evaluación de los resultados genéticos se hará sólo por grupos (por ejemplo, varones/mujeres, grupos de edad, etc.) y no de forma individual. Debe comprender que los resultados de valor que se pudiera obtener provendrían del estudio de múltiples muestras, y en ningún caso de la de su hijo o representado exclusivamente.

Las implicaciones médicas de los resultados del análisis genético de las muestras de saliva, si es que las hay, sólo serán conocidas cuando se hayan completado los proyectos de investigación. Los resultados solo se conocerán de forma genérica (esto es, todos los pacientes en conjunto) y no de forma individualizada.

El tratamiento, la comunicación y la cesión de datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustan a lo dispuesto en la Ley de Protección de Datos (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre) y usted puede ejercer el derecho de modificación, oposición y cancelación de datos.

| | | |
|---|---|-----------------------------|
|  | HOJA DE INFORMACIÓN AL SUJETO CONSENTIMIENTO INFORMADO | Centro: |
| | | Código: 2007PGK-TDAH |

Los resultados del estudio podrán ser comunicados en reuniones científicas, congresos médicos o publicaciones científicas, manteniéndose siempre una estricta confidencialidad sobre la identidad de los pacientes (no se dirá nunca el nombre de su hijo o representado, sino que se mostrarán los datos en conjunto), según la Ley Orgánica de Protección de Datos.

1.7 CESIÓN Y EXPLOTACIÓN DE RESULTADOS

Usted cede la muestra de saliva de su hijo o representado para el fin anteriormente expuesto. Las muestras de saliva no se utilizarán para ningún otro fin, ni se comercializará con ellas, sino que servirán para los objetivos científicos anteriormente descritos. En el caso de que ese test sea útil, podrá ser posteriormente comercializado.

1.8 BENEFICIO PARA EL SUJETO

El poder diagnosticar cualquier enfermedad cuánto antes y con un método sencillo y no peligroso para el paciente resulta siempre un beneficio para el paciente.

Probablemente su hijo o representado no obtendrá ningún beneficio directo por participar en este proyecto, pero sí la satisfacción de ayudar a otros pacientes en el futuro, puesto que esta prueba podría ayudar en la evaluación del pronóstico y respuesta a fármacos en del trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH).

Si usted está de acuerdo en permitir participar a su hijo o representado de forma voluntaria en este estudio debe rellenar el consentimiento informado que se adjunta a continuación.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | HOJA DE INFORMACIÓN AL SUJETO CONSENTIMIENTO INFORMADO | Centro: |
| | | Código: 2007PGK-TDAH |

(COPIA PARA EL INVESTIGADOR)

2 DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO Y FIRMA POR PADRES O TUTORES

Proyecto: Estudio clínico multicéntrico de investigación para el desarrollo de un sistema no invasivo *in Vitro* (DNA-CHIP de genotipado) para el pronóstico y predicción de respuesta a tratamiento del trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH).

Yo, _____ en representación de _____ (nombre de paciente), en calidad de _____

He leído la información que se me ha entregado. He podido hacer preguntas sobre el proyecto. He recibido suficiente información sobre el mismo. He hablado de ello con _____

Comprendo que la participación en el proyecto es voluntaria y puedo retirar mi consentimiento cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en los cuidados médicos de mi hijo/a.

Presto libremente mi conformidad para la participación de mi hijo/a en el proyecto así como acepto responder a los cuestionarios que se decidan pasar para la evaluación de la enfermedad de mi hijo/a (Test ADHD Rating Scale version padre y la Escala de Impresión Clínica Global):

Sí No
doy doy (Marcar con una X lo que seleccione)

| | | |
|--------------------------|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Mi consentimiento para participar en este estudio |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Mi consentimiento para participar en otros estudios futuros con nuevos genes relacionados con la enfermedad. |

FIRMA DEL Padre/Tutor Nombre Fecha

FIRMA DE LA Madre/Tutor Nombre Fecha

Yo he explicado por completo los detalles relevantes de este proyecto al paciente y/o la persona autorizada a dar el consentimiento en su nombre.

FIRMA Nombre Fecha

Se entrega copia de este documento al paciente.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | HOJA DE INFORMACIÓN AL SUJETO CONSENTIMIENTO INFORMADO | Centro: |
| | | Código: 2007PGK-TDAH |

(COPIA PARA EL INVESTIGADOR)

3 CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTES MAYORES DE 12 AÑOS

Yo,....., libremente, decido participar en el proyecto de investigación denominado:

"Estudio clínico multicéntrico de investigación para el desarrollo un sistema no invasivo *in Vitro* (DNA-CHIP de genotipado) para el pronóstico y predicción de respuesta a tratamiento del trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH)"

Mi participación consiste en dar un poco de mi saliva, que se utilizará para ver si funciona un test que sirve para estudiar la enfermedad llamada déficit de atención y estudiar más dicha enfermedad.

Mi médico me ha dicho que este estudio servirá para conocer más esa enfermedad y que los resultados que salgan, se contarán a otros médicos pero siempre manteniendo en secreto la identidad de todos y cada uno de los jóvenes que hemos participado. Para eso, no se va a poner mi nombre o apellidos en ningún sitio que puedan verlo otras personas y mi saliva va a ser conocida sólo por un código.

He entendido que no hay peligro en participar en el estudio porque sólo se me pide que eche un poco de saliva en un bote especial (¡y eso no duele!). Con esa saliva estudiarán mis genes relacionados con la enfermedad, y lo hará en el laboratorio de la empresa que investiga estos test para el diagnóstico (y que se llama Progenika Biopharma). Además tendré que responder a una breve encuesta donde se ve cómo me encuentro.

Sé que mi participación consiste únicamente en dar esa saliva y que no tengo que volver otro día al hospital por causa del estudio. También sé que no nos van a pagar ningún dinero ni regalo por esta participación, pero entiendo que los resultados que se obtengan pueden ser beneficiosos en el futuro a pacientes con la misma enfermedad o enfermedades relacionadas con la misma (aunque como puede tardarse muchos años en investigar, quizás no me sirvan ya a mí mismo).

Nadie me obliga a participar y puedo decir que no quiero dar esa saliva, sin tener que explicar por qué no quiero. Además, puedo decir ahora que no o si ahora digo que sí, otro día puedo decir que no. Y tanto si digo sí como si digo no, mi médico me seguirá tratando igual de bien que hasta ahora.

El médico que me ha explicado esto se llama.....(escribe aquí su nombre)

Y como quiero participar en el estudio, pongo mi nombre a continuación:

.....

Fecha:
Firma:

Fecha:
Firma:

Fecha:
Firma:

Firmado paciente
(Si mayor de 12 años)
Nombre:

Firmado: padre / tutor legal
Nombre:

Firmado: Investigador
Nombre:

Se entrega copia de este documento al paciente.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | HOJA DE INFORMACIÓN AL SUJETO CONSENTIMIENTO INFORMADO | Centro: |
| | | Código: 2007PGK-TDAH |

(COPIA PARA EL PACIENTE)

4 DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO Y FIRMA POR PADRES O TUTORES

Proyecto: Estudio clínico multicéntrico de investigación para el desarrollo de un sistema no invasivo *in Vitro* (DNA-CHIP de genotipado) para el pronóstico y predicción de respuesta a tratamiento del trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH).

Yo, _____ en representación de _____ (nombre de paciente), en calidad de _____

He leído la información que se me ha entregado. He podido hacer preguntas sobre el proyecto. He recibido suficiente información sobre el mismo. He hablado de ello con _____

Comprendo que la participación en el proyecto es voluntaria y puedo retirar mi consentimiento cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en los cuidados médicos de mi hijo/a.

Presto libremente mi conformidad para la participación de mi hijo/a en el proyecto así como acepto responder a los cuestionarios que se decidan pasar para la evaluación de la enfermedad de mi hijo/a (Test ADHD Rating Scale version padre y la Escala de Impresión Clínica Global):

Sí No
doy doy (Marcar con una X lo que seleccione)

| | | |
|--------------------------|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Mi consentimiento para participar en este estudio |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Mi consentimiento para participar en otros estudios futuros con nuevos genes relacionados con la enfermedad. |

FIRMA DEL Padre/Tutor Nombre Fecha

FIRMA DE LA Madre/Tutor Nombre Fecha

Yo he explicado por completo los detalles relevantes de este proyecto al paciente y/o la persona autorizada a dar el consentimiento en su nombre.

FIRMA Nombre Fecha

Se entrega copia de este documento al paciente.

| | | |
|---|---|----------------------|
|  | HOJA DE INFORMACIÓN AL SUJETO CONSENTIMIENTO INFORMADO | Centro: |
| | | Código: 2007PGK-TDAH |

(COPIA PARA EL PACIENTE)

5 CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTES MAYORES DE 12 AÑOS

Yo,....., libremente, decido participar en el proyecto de investigación denominado:

"Estudio clínico multicéntrico de investigación para el desarrollo un sistema no invasivo *in Vitro* (DNA-CHIP de genotipado) para el pronóstico y predicción de respuesta a tratamiento del trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH)"

Mi participación consiste en dar un poco de mi saliva, que se utilizará para ver si funciona un test que sirve para estudiar la enfermedad llamada déficit de atención y estudiar más dicha enfermedad.

Mi médico me ha dicho que este estudio servirá para conocer más esa enfermedad y que los resultados que salgan, se contarán a otros médicos pero siempre manteniendo en secreto la identidad de todos y cada uno de los jóvenes que hemos participado. Para eso, no se va a poner mi nombre o apellidos en ningún sitio que puedan verlo otras personas y mi saliva va a ser conocida sólo por un código.

He entendido que no hay peligro en participar en el estudio porque sólo se me pide que eche un poco de saliva en un bote especial (¡y eso no duele!). Con esa saliva estudiarán mis genes relacionados con la enfermedad, y lo hará en el laboratorio de la empresa que investiga estos test para el diagnóstico (y que se llama Progenika Biopharma). Además tendré que responder a una breve encuesta donde se ve cómo me encuentro.

Sé que mi participación consiste únicamente en dar esa saliva y que no tengo que volver otro día al hospital por causa del estudio. También sé que no nos van a pagar ningún dinero ni regalo por esta participación, pero entiendo que los resultados que se obtengan pueden ser beneficiosos en el futuro a pacientes con la misma enfermedad o enfermedades relacionadas con la misma (aunque como puede tardarse muchos años en investigar, quizás no me sirvan ya a mí mismo).

Nadie me obliga a participar y puedo decir que no quiero dar esa saliva, sin tener que explicar por qué no quiero. Además, puedo decir ahora que no o si ahora digo que sí, otro día puedo decir que no. Y tanto si digo sí como si digo no, mi médico me seguirá tratando igual de bien que hasta ahora.

El médico que me ha explicado esto se llama.....(escribe aquí su nombre)

Y como quiero participar en el estudio, pongo mi nombre a continuación:

.....

Fecha:
Firma:

Fecha:
Firma:

Fecha:
Firma:

Firmado: paciente
(Si mayor de 12 años)
Nombre:

Firmado: padre / tutor legal
Nombre:

Firmado: Investigador
Nombre:

Se entrega copia de este documento al paciente.

ANEXO III: CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS DE PACIENTES DE TDAH Y CONTROLES SANOS SIN ENFERMEDADES PSIQUIÁTRICAS DIAGNOSTICADAS

A) Tabla que resume las principales características de las muestras de pacientes de TDAH que han sido utilizadas en este estudio. Las primeras 276 fueron las seleccionadas para participar en el estudio piloto y todas ellas (399) se incluyeron en el análisis completo. Se muestra el código interno que se le asignó a cada una de las muestras en el momento de su recepción, la edad en el momento del reclutamiento, el periodo de evolución hasta dicho momento, el sexo, el subtipo de TDAH diagnosticado y el tratamiento actual. En este campo, "MTF" significa metilfenidato, "ATX" atomoxetina y "OTRO" cualquier otro fármaco, pudiéndose dar todas las combinaciones posibles. En cualquiera de los campos, el símbolo "?" significa valor perdido.

| Código Muestra | Edad (años) | Periodo de evolución (años) | Sexo | Subtipo TDAH | Tratamiento actual |
|----------------|-------------|-----------------------------|-------|--------------|--------------------|
| AD001 | 37 | 3 | Mujer | Combinado | MTF+OTRO |
| AD002 | 17 | 9 | Varón | ? | MTF |
| AD003 | 15 | 9 | Varón | Combinado | MTF+OTRO |
| AD004 | 12 | 3 | Mujer | Inatento | MTF |
| AD005 | 9 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD006 | 12 | 4 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD007 | 12 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD008 | 14 | 4 | Varón | Combinado | MTF |
| AD009 | 15 | 4 | Varón | Inatento | MTF |
| AD010 | 16 | 3 | Mujer | Inatento | OTRO |
| AD011 | 16 | 3 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD012 | 12 | 2 | Varón | Inatento | MTF |
| AD013 | 12 | 2 | Mujer | Inatento | MTF |
| AD014 | 8 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD015 | 15 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD016 | 8 | 4 | Varón | Hip-imp | MTF |
| AD017 | 14 | 7 | Varón | Combinado | MTF |
| AD018 | 16 | 8 | Varón | Inatento | MTF |
| AD019 | 17 | 3 | Mujer | Inatento | MTF |
| AD020 | 14 | 8 | Varón | Inatento | MTF |
| AD021 | 14 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD022 | 12 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD023 | 13 | 4 | Varón | Combinado | ATX+OTRO |
| AD024 | 12 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD025 | 11 | 3 | Varón | Inatento | ATX |
| AD026 | 13 | 5 | Varón | Combinado | MTF |
| AD027 | 32 | 4 | Varón | ? | MTF |
| AD028 | 13 | 6 | Varón | Combinado | MTF |
| AD029 | 12 | 3 | Varón | Inatento | MTF |
| AD030 | 12 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD031 | 8 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD032 | 9 | 3 | Varón | Inatento | MTF |
| AD033 | 15 | 7 | Varón | Combinado | MTF |
| AD034 | 17 | 8 | Varón | Combinado | ? |
| AD035 | 10 | 3 | Varón | Inatento | MTF |
| AD036 | 11 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD037 | 14 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD038 | 11 | 4 | Mujer | Inatento | MTF |
| AD039 | 14 | 3 | Varón | Combinado | MTF |

| Código Muestra | Edad (años) | Periodo de evolución (años) | Sexo | Subtipo TDAH | Tratamiento actual |
|----------------|-------------|-----------------------------|-------|--------------|--------------------|
| AD040 | 13 | 2 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD041 | 11 | 5 | Varón | Combinado | MTF |
| AD042 | 22 | 14 | Varón | Combinado | ? |
| AD043 | 11 | 3 | Mujer | Inatento | MTF |
| AD044 | 14 | 5 | Varón | Hip-imp | MTF+OTRO |
| AD045 | 10 | 5 | Varón | Combinado | MTF |
| AD046 | 13 | 5 | Varón | Combinado | MTF |
| AD047 | 13 | 4 | Mujer | Inatento | MTF |
| AD048 | 16 | 4 | Varón | Combinado | OTRO |
| AD049 | 13 | 4 | Varón | Combinado | MTF+OTRO |
| AD050 | 13 | 5 | Varón | Combinado | MTF |
| AD051 | 14 | 6 | Varón | Inatento | ? |
| AD052 | 13 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD053 | 16 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD054 | 10 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD055 | 14 | 5 | Varón | Combinado | OTRO |
| AD056 | 14 | 5 | Varón | Combinado | MTF |
| AD057 | 16 | 7 | Varón | Combinado | MTF |
| AD058 | 9 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD059 | 19 | 7 | Varón | Inatento | MTF |
| AD060 | 14 | 5 | Varón | Combinado | MTF |
| AD061 | 12 | 3 | Mujer | Combinado | MTF+ATX |
| AD062 | 13 | 5 | Varón | Combinado | MTF |
| AD063 | 6 | 3 | Varón | Inatento | MTF |
| AD064 | 8 | 4 | Varón | Combinado | MTF |
| AD065 | 10 | 3 | Mujer | Inatento | MTF |
| AD066 | 9 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD067 | 12 | 8 | Varón | Combinado | MTF |
| AD068 | 11 | 6 | Varón | Hip-imp | MTF |
| AD069 | 14 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD070 | 17 | 10 | Varón | Inatento | MTF |
| AD071 | 14 | 7 | Varón | Combinado | MTF |
| AD072 | 15 | 6 | Varón | Combinado | ? |
| AD073 | 7 | 1 | Varón | Combinado | ATX |
| AD074 | 14 | 5 | Varón | Inatento | MTF |
| AD075 | 14 | 3 | Varón | Inatento | MTF |
| AD076 | 8 | 4 | Varón | ? | MTF |
| AD077 | 13 | 6 | Varón | Combinado | MTF |
| AD078 | 16 | 3 | Varón | Combinado | ATX |
| AD079 | 16 | 6 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD080 | 13 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD081 | 10 | 3 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD082 | 10 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD083 | 8 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD084 | 10 | 2 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD085 | 13 | 2 | Mujer | Inatento | MTF+OTRO |

| Código Muestra | Edad (años) | Periodo de evolución (años) | Sexo | Subtipo TDAH | Tratamiento actual |
|----------------|-------------|-----------------------------|-------|--------------|--------------------|
| AD086 | 10 | 3 | Mujer | Inatento | MTF+OTRO |
| AD087 | 10 | 6 | Mujer | Combinado | MTF+OTRO |
| AD088 | 13 | 3 | Varón | Combinado | OTRO |
| AD089 | 12 | 3 | ? | Combinado | ATX |
| AD090 | 16 | 10 | Varón | Combinado | MTF |
| AD091 | 14 | 5 | Varón | Combinado | MTF |
| AD092 | 15 | 7 | Varón | Combinado | ATX |
| AD093 | 10 | 3 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD094 | 17 | 7 | Varón | Combinado | MTF+OTRO |
| AD095 | 11 | 3 | Varón | Combinado | MTF+OTRO |
| AD096 | 12 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD097 | 13 | 3 | Varón | Inatento | MTF |
| AD098 | 15 | 8 | Varón | Combinado | MTF |
| AD099 | 13 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD100 | 10 | 3 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD101 | 12 | 3 | Varón | Inatento | MTF |
| AD102 | 14 | 7 | Varón | Combinado | ATX |
| AD103 | 15 | 8 | Varón | Combinado | MTF+OTRO |
| AD104 | 18 | 3 | Varón | Inatento | MTF |
| AD105 | 13 | 7 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD106 | 14 | 6 | Varón | Combinado | MTF |
| AD107 | 14 | 7 | Varón | Hip-imp | MTF+OTRO |
| AD108 | 11 | 4 | Varón | Hip-imp | MTF |
| AD109 | 15 | 5 | Mujer | Inatento | MTF |
| AD110 | 16 | 9 | Varón | Inatento | MTF |
| AD111 | 15 | 7 | Varón | Combinado | OTRO |
| AD112 | 15 | 7 | Varón | Hip-imp | OTRO |
| AD113 | 15 | 3 | Varón | Inatento | MTF |
| AD114 | 14 | 5 | Varón | Combinado | OTRO |
| AD115 | 16 | 3 | Varón | Inatento | MTF |
| AD116 | 13 | 4 | Varón | Inatento | MTF+ATX |
| AD117 | 13 | 5 | Mujer | Inatento | MTF |
| AD118 | 11 | 2 | Varón | Combinado | MTF+OTRO |
| AD119 | 9 | 4 | Varón | Combinado | MTF |
| AD120 | 9 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD121 | 16 | 4 | Varón | Combinado | MTF |
| AD122 | 10 | 6 | Varón | Hip-imp | MTF |
| AD123 | 12 | 4 | Mujer | Combinado | MTF+OTRO |
| AD124 | 16 | 3 | Varón | Combinado | MTF+OTRO |
| AD125 | 12 | 4 | Varón | Inatento | MTF |
| AD126 | 14 | 3 | Varón | Inatento | MTF |
| AD127 | 12 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD128 | 10 | 4 | Varón | Combinado | MTF |
| AD129 | 15 | 6 | Varón | Hip-imp | MTF |
| AD130 | 13 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD131 | 14 | 4 | Varón | Inatento | ATX |
| AD132 | 12 | 4 | Varón | Combinado | MTF |
| AD133 | 15 | 9 | Varón | Combinado | MTF |
| AD134 | 17 | 6 | Varón | Combinado | MTF+OTRO |

| Código Muestra | Edad (años) | Periodo de evolución (años) | Sexo | Subtipo TDAH | Tratamiento actual |
|----------------|-------------|-----------------------------|-------|--------------|--------------------|
| AD135 | 13 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD136 | 11 | 4 | Varón | Hip-imp | MTF |
| AD137 | 15 | 11 | Varón | Hip-imp | MTF |
| AD138 | 13 | 2 | Varón | Inatento | MTF |
| AD139 | 13 | 4 | Varón | Hip-imp | MTF+OTRO |
| AD140 | 10 | 3 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD141 | 15 | 2 | Varón | Inatento | MTF |
| AD142 | 15 | 5 | Varón | Combinado | MTF+ATX |
| AD143 | 10 | 3 | Varón | Inatento | ? |
| AD144 | 14 | 6 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD145 | 8 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD146 | 13 | 9 | Varón | Combinado | MTF |
| AD147 | 14 | 4 | Varón | Combinado | MTF |
| AD148 | 10 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD149 | 11 | 3 | Varón | Inatento | MTF |
| AD150 | 11 | 4 | Varón | Combinado | MTF |
| AD151 | 13 | 5 | Varón | Inatento | ATX |
| AD152 | 12 | 5 | Varón | Combinado | MTF |
| AD153 | 13 | 5 | Varón | Combinado | MTF |
| AD154 | 12 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD155 | 15 | 3 | Varón | Inatento | MTF |
| AD156 | 21 | 3 | Mujer | Inatento | ? |
| AD157 | 14 | 5 | Varón | Combinado | MTF+ATX |
| AD158 | 15 | 7 | Varón | Combinado | MTF |
| AD159 | 11 | 3 | Varón | Combinado | ATX |
| AD160 | 19 | 4 | Varón | Inatento | ATX |
| AD161 | 11 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD162 | 10 | 1 | Varón | Combinado | MTF |
| AD163 | 10 | 2 | Varón | Combinado | ATX |
| AD164 | 12 | 2 | Varón | Inatento | ? |
| AD165 | 12 | 4 | Varón | Combinado | MTF+ATX |
| AD166 | 10 | 2 | Mujer | Inatento | MTF |
| AD167 | 6 | 3 | Mujer | Inatento | MTF |
| AD168 | 16 | 3 | Mujer | Inatento | MTF+OTRO |
| AD169 | 9 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD170 | 10 | 5 | Varón | Combinado | MTF |
| AD171 | 10 | 3 | Varón | Hip-imp | MTF |
| AD172 | 12 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD173 | 13 | 2 | Varón | Inatento | MTF |
| AD174 | 12 | 5 | Varón | Inatento | MTF |
| AD175 | 12 | 4 | Varón | Inatento | MTF |
| AD176 | 12 | 3 | Varón | Inatento | ATX |
| AD177 | 18 | 3 | Varón | Inatento | ? |
| AD178 | 15 | 6 | Varón | Combinado | MTF |
| AD179 | 15 | 5 | Varón | Combinado | MTF |
| AD180 | 14 | 5 | Mujer | Inatento | ATX |
| AD181 | 7 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD182 | 17 | 6 | Varón | Inatento | MTF |
| AD183 | 12 | 6 | Mujer | Combinado | MTF |

| Código Muestra | Edad (años) | Periodo de evolución (años) | Sexo | Subtipo TDAH | Tratamiento actual |
|----------------|-------------|-----------------------------|-------|--------------|--------------------|
| AD184 | 14 | 2 | Varón | Inatento | MTF+ATX |
| AD185 | 14 | 4 | Varón | Combinado | MTF |
| AD186 | 16 | 2 | Mujer | Inatento | MTF |
| AD187 | 14 | 6 | Varón | ? | MTF |
| AD188 | 15 | 2 | Varón | Inatento | ATX |
| AD189 | 15 | 2 | Varón | Inatento | MTF |
| AD190 | 9 | 4 | Varón | Combinado | MTF |
| AD191 | 14 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD192 | 14 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD193 | 14 | 1 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD194 | 18 | 7 | Mujer | Combinado | ATX |
| AD195 | 13 | 2 | Varón | Inatento | MTF |
| AD196 | 10 | 2 | Varón | Inatento | MTF |
| AD197 | 15 | 3 | Varón | Inatento | MTF |
| AD198 | 14 | 4 | Mujer | Inatento | MTF |
| AD199 | 12 | 4 | Mujer | Combinado | ATX |
| AD200 | 14 | 4 | Varón | Inatento | MTF |
| AD201 | 10 | 2 | Varón | Inatento | MTF |
| AD202 | 11 | 4 | Varón | Combinado | MTF |
| AD203 | 11 | 4 | Varón | Combinado | MTF |
| AD204 | 10 | 3 | Varón | Inatento | MTF |
| AD205 | 15 | 7 | Varón | Inatento | MTF |
| AD206 | 16 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD207 | 14 | 5 | Varón | Hip-imp | OTRO |
| AD208 | 20 | 7 | Mujer | Hip-imp | MTF |
| AD209 | 14 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD210 | 14 | 6 | Varón | Combinado | MTF |
| AD211 | 12 | 2 | Varón | Combinado | ATX |
| AD212 | 9 | 4 | Varón | Combinado | MTF |
| AD213 | 9 | 3 | Varón | Combinado | MTF+OTRO |
| AD214 | 11 | 5 | Varón | Combinado | MTF |
| AD215 | 22 | 2 | Mujer | Inatento | MTF |
| AD216 | 12 | 6 | Mujer | Combinado | ATX |
| AD217 | 12 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD218 | 9 | 2 | Varón | Combinado | OTRO |
| AD219 | 9 | 1 | Mujer | Inatento | ATX |
| AD220 | 12 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD221 | 12 | 2 | Varón | Inatento | MTF |
| AD222 | 9 | 2 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD223 | 12 | 3 | Varón | Inatento | MTF |
| AD224 | 12 | 3 | Varón | Combinado | MTF+OTRO |
| AD225 | 15 | 4 | Varón | Combinado | MTF+OTRO |
| AD226 | 10 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD227 | 16 | 4 | Varón | Combinado | MTF |
| AD228 | 9 | 2 | Varón | ? | MTF |
| AD229 | 11 | 5 | Varón | Inatento | MTF |
| AD230 | 13 | 12 | Mujer | Combinado | ATX |
| AD231 | 10 | 2 | Mujer | Combinado | ATX |
| AD232 | 8 | 1 | Mujer | Inatento | MTF |

| Código Muestra | Edad (años) | Periodo de evolución (años) | Sexo | Subtipo TDAH | Tratamiento actual |
|----------------|-------------|-----------------------------|-------|--------------|--------------------|
| AD233 | 12 | 3 | Varón | Combinado | ATX |
| AD234 | 12 | 3 | Varón | Inatento | MTF |
| AD235 | 15 | 5 | Varón | Combinado | MTF |
| AD236 | 13 | 5 | Varón | Combinado | MTF+ATX |
| AD237 | 14 | 2 | Varón | Combinado | ATX |
| AD238 | 13 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD239 | 9 | 2 | Mujer | Combinado | MTF+OTRO |
| AD240 | 14 | 5 | Varón | Combinado | MTF |
| AD241 | 13 | 4 | Varón | Combinado | MTF |
| AD242 | 15 | 4 | Varón | Hip-imp | MTF |
| AD243 | 15 | 6 | Varón | Combinado | MTF+OTRO |
| AD244 | 11 | 1 | Varón | Combinado | ATX |
| AD245 | 13 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD246 | 14 | 3 | Varón | Hip-imp | MTF+OTRO |
| AD247 | 10 | 3 | Varón | Inatento | MTF |
| AD248 | 13 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD249 | 13 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD250 | 12 | 5 | Varón | Combinado | MTF |
| AD251 | 11 | 3 | Mujer | Hip-imp | MTF |
| AD252 | 13 | 4 | Varón | Combinado | MTF |
| AD253 | 15 | 2 | Varón | Combinado | ATX |
| AD254 | 10 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD255 | 13 | 5 | Varón | Combinado | MTF |
| AD256 | 12 | 2 | Varón | Hip-imp | MTF |
| AD257 | 11 | 3 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD258 | 18 | 11 | Varón | Combinado | ninguno |
| AD259 | 9 | 2 | Mujer | Combinado | ATX |
| AD260 | 12 | 2 | Varón | ? | MTF |
| AD261 | 12 | 5 | Varón | Hip-imp | MTF+OTRO |
| AD262 | 10 | 2 | Mujer | Combinado | ATX |
| AD263 | 15 | 4 | Varón | ? | ATX |
| AD264 | 14 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD265 | 21 | 5 | Varón | ? | ? |
| AD266 | 15 | 8 | Varón | Combinado | MTF |
| AD267 | 14 | 6 | Varón | Combinado | MTF |
| AD268 | 13 | 5 | Mujer | ? | MTF+ATX |
| AD269 | 16 | 5 | Varón | ? | MTF |
| AD270 | 15 | 6 | Varón | Combinado | MTF |
| AD271 | 16 | 4 | Varón | Combinado | MTF |
| AD272 | 15 | 15 | Varón | ? | MTF |
| AD273 | 14 | 2 | Varón | Hip-imp | MTF |
| AD274 | 11 | 3 | Varón | Combinado | MTF+OTRO |
| AD275 | 11 | 3 | Varón | ? | MTF |
| AD276 | 17 | 3 | Varón | ? | MTF |
| AD277 | 14 | 2 | Mujer | Inatento | MTF |
| AD278 | 10 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD279 | 10 | 3 | Mujer | Combinado | MTF+ATX |
| AD280 | 36 | 7 | Varón | Combinado | MTF |
| AD281 | 14 | 5 | Varón | Combinado | MTF |

| Código Muestra | Edad (años) | Periodo de evolución (años) | Sexo | Subtipo TDAH | Tratamiento actual |
|----------------|-------------|-----------------------------|-------|--------------|--------------------|
| AD282 | 13 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD283 | 12 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD284 | 12 | 2 | Varón | Inatento | MTF |
| AD285 | 13 | 2 | Varón | Combinado | ninguno |
| AD286 | 11 | 3 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD287 | 11 | 4 | Varón | Combinado | ATX+OTRO |
| AD288 | 9 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD289 | 15 | 8 | Varón | Combinado | MTF |
| AD290 | 13 | 3 | Varón | Inatento | MTF |
| AD291 | 14 | 2 | Varón | Inatento | MTF |
| AD292 | 16 | 3 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD293 | 11 | 6 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD294 | 13 | 3 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD295 | 12 | 5 | Varón | Combinado | ATX |
| AD296 | 10 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD297 | 13 | 5 | Mujer | Inatento | MTF |
| AD298 | 10 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD299 | 13 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD300 | 12 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD301 | 16 | 6 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD302 | 12 | 3 | Varón | ? | MTF |
| AD303 | 11 | 5 | Varón | Combinado | MTF |
| AD304 | 11 | 5 | Varón | Combinado | MTF |
| AD305 | 11 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD306 | 14 | 2 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD307 | 14 | 3 | Varón | Inatento | MTF+OTRO |
| AD308 | 10 | 3 | Varón | Inatento | MTF |
| AD309 | 11 | 2 | Varón | Combinado | ATX |
| AD310 | 15 | 6 | Varón | Combinado | MTF+OTRO |
| AD311 | 10 | 2 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD312 | 10 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD313 | 11 | 4 | Varón | Inatento | MTF+OTRO |
| AD314 | 11 | 2 | Varón | Hip-imp | OTRO |
| AD315 | 13 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD316 | 10 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD317 | 10 | 3 | Varón | Inatento | MTF |
| AD318 | 15 | 4 | Varón | Combinado | MTF |
| AD319 | 9 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD320 | 13 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD321 | 10 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD322 | 14 | 6 | Mujer | Combinado | ATX |
| AD323 | 10 | 8 | Varón | Hip-imp | MTF |
| AD324 | 11 | 1 | Varón | Combinado | MTF |
| AD325 | 13 | 3 | Varón | Combinado | MTF+OTRO |
| AD326 | 14 | 4 | Varón | Combinado | MTF |
| AD327 | 15 | 4 | Mujer | Inatento | ATX |
| AD328 | 11 | 3 | Mujer | Hip-imp | MTF |
| AD329 | 10 | 5 | Varón | Inatento | MTF |
| AD330 | 10 | 5 | Mujer | Combinado | MTF |

| Código Muestra | Edad (años) | Periodo de evolución (años) | Sexo | Subtipo TDAH | Tratamiento actual |
|----------------|-------------|-----------------------------|-------|--------------|--------------------|
| AD331 | 10 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD332 | 10 | 2 | Varón | Combinado | ATX |
| AD333 | 11 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD334 | 11 | 4 | Varón | Combinado | MTF |
| AD335 | 11 | 3 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD336 | 14 | 2 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD337 | 13 | 1 | Varón | Combinado | MTF |
| AD338 | 11 | 4 | Varón | Inatento | OTRO |
| AD339 | 11 | 3 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD340 | 10 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD341 | 13 | 3 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD342 | 15 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD343 | 12 | 4 | Varón | ? | MTF+OTRO |
| AD344 | 14 | 1 | Varón | Combinado | MTF |
| AD345 | 12 | 5 | Varón | Combinado | MTF |
| AD346 | 11 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD347 | 16 | 3 | Varón | Inatento | MTF |
| AD348 | 11 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD349 | 15 | 8 | Varón | Combinado | MTF |
| AD350 | 14 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD351 | 14 | 4 | Mujer | Combinado | ATX |
| AD352 | 11 | 2 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD353 | 10 | 1 | Varón | Combinado | MTF |
| AD354 | 13 | 4 | Varón | Combinado | MTF |
| AD355 | 11 | 3 | Varón | ? | MTF |
| AD356 | 11 | 2 | Varón | Combinado | MTF+OTRO |
| AD357 | 17 | 9 | Varón | Combinado | ? |
| AD358 | 11 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD359 | 9 | 2 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD360 | 12 | 2 | Varón | Combinado | MTF+OTRO |
| AD361 | 15 | 2 | Mujer | Combinado | MTF+OTRO |
| AD362 | 11 | 4 | Varón | Combinado | ATX |
| AD363 | 47 | 3 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD364 | 15 | 3 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD365 | 15 | 8 | Varón | Combinado | ? |
| AD366 | 10 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD367 | 7 | 2 | Varón | Hip-imp | MTF+OTRO |
| AD368 | 14 | 2 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD369 | 12 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD370 | 11 | 3 | Varón | Combinado | MTF+OTRO |
| AD371 | 15 | 8 | Varón | Combinado | MTF |
| AD372 | 16 | 9 | Varón | Hip-imp | MTF+OTRO |
| AD373 | 15 | 13 | Varón | Combinado | MTF |
| AD374 | 16 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD375 | 20 | 10 | Mujer | Inatento | ATX |
| AD376 | 10 | 3 | Varón | Combinado | OTRO |
| AD377 | 10 | 2 | Mujer | Combinado | MTF+OTRO |
| AD378 | 14 | 5 | Varón | Combinado | MTF |
| AD379 | 14 | 2 | Varón | Inatento | ATX |

| Código Muestra | Edad (años) | Periodo de evolución (años) | Sexo | Subtipo TDAH | Tratamiento actual |
|----------------|-------------|-----------------------------|-------|--------------|--------------------|
| AD380 | 12 | 4 | Varón | Combinado | ATX |
| AD381 | 13 | 2 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD382 | 11 | 3 | Varón | Inatento | MTF |
| AD383 | 12 | 1 | Varón | Inatento | MTF |
| AD384 | 7 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD385 | 7 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD386 | 15 | 6 | Varón | Combinado | MTF |
| AD387 | 16 | 1 | Varón | Combinado | MTF |
| AD388 | 13 | 4 | Varón | Inatento | ? |
| AD389 | 13 | 6 | Varón | Combinado | ATX |
| AD390 | 12 | 4 | Varón | Combinado | MTF |
| AD391 | 14 | 6 | Varón | Combinado | MTF+OTRO |
| AD392 | 14 | 5 | Varón | Combinado | MTF |
| AD393 | 11 | 5 | Varón | Hip-imp | MTF |
| AD394 | 14 | 2 | Varón | Combinado | MTF |
| AD395 | 14 | 3 | Varón | Combinado | MTF |
| AD396 | 12 | 6 | Mujer | Combinado | MTF |
| AD397 | 7 | 4 | Varón | Combinado | MTF |
| AD398 | 14 | 4 | Varón | Combinado | MTF |
| AD399 | 8 | 2 | Varón | Combinado | MTF |

B) Tabla que resume las principales características de las muestras de ADN de individuos controles sanos (sin enfermedades psiquiátricas diagnosticadas) que fueron solicitadas. Se muestra el código interno que se les asignó a los ADN en el momento de su recepción, así como la edad y sexo del donante.

| Código | Edad (años) | Sexo |
|--------|-------------|-------|
| C001 | 28 | Varón |
| C002 | 37 | Varón |
| C003 | 32 | Varón |
| C004 | 39 | Varón |
| C005 | 37 | Varón |
| C006 | 38 | Varón |
| C007 | 33 | Varón |
| C008 | 35 | Varón |
| C009 | 36 | Varón |
| C010 | 35 | Varón |
| C011 | 37 | Varón |
| C012 | 33 | Varón |
| C013 | 24 | Varón |
| C014 | 25 | Varón |
| C015 | 30 | Varón |
| C016 | 39 | Varón |
| C017 | 22 | Varón |
| C018 | 37 | Varón |
| C019 | 20 | Varón |

| Código | Edad (años) | Sexo |
|--------|-------------|-------|
| C201 | 18 | Varón |
| C202 | 19 | Varón |
| C203 | 20 | Varón |
| C204 | 25 | Varón |
| C205 | 25 | Varón |
| C206 | 25 | Varón |
| C207 | 20 | Varón |
| C208 | 19 | Varón |
| C209 | 20 | Varón |
| C210 | 18 | Varón |
| C211 | 18 | Varón |
| C212 | 19 | Varón |
| C213 | 19 | Varón |
| C214 | 25 | Varón |
| C215 | 22 | Varón |
| C216 | 22 | Varón |
| C217 | 19 | Varón |
| C218 | 20 | Varón |
| C219 | 19 | Varón |

| Código | Edad (años) | Sexo |
|--------|-------------|-------|
| C020 | 29 | Varón |
| C021 | 39 | Varón |
| C022 | 30 | Varón |
| C023 | 22 | Varón |
| C024 | 19 | Varón |
| C025 | 37 | Varón |
| C026 | 21 | Varón |
| C027 | 26 | Varón |
| C028 | 28 | Varón |
| C029 | 22 | Varón |
| C030 | 34 | Varón |
| C031 | 25 | Varón |
| C032 | 38 | Varón |
| C033 | 38 | Varón |
| C034 | 24 | Varón |
| C035 | 36 | Varón |
| C036 | 39 | Varón |
| C037 | 30 | Varón |
| C038 | 30 | Varón |
| C039 | 30 | Varón |
| C040 | 38 | Varón |
| C041 | 35 | Varón |
| C042 | 26 | Varón |
| C043 | 33 | Varón |
| C044 | 35 | Varón |
| C045 | 37 | Varón |
| C046 | 37 | Varón |
| C047 | 36 | Varón |
| C048 | 36 | Varón |
| C049 | 26 | Varón |
| C050 | 31 | Varón |
| C051 | 34 | Varón |
| C052 | 25 | Varón |
| C053 | 29 | Varón |
| C054 | 38 | Varón |
| C055 | 30 | Varón |
| C056 | 36 | Varón |
| C057 | 38 | Varón |
| C058 | 33 | Varón |
| C059 | 34 | Varón |
| C060 | 24 | Varón |
| C061 | 26 | Varón |
| C062 | 36 | Varón |
| C063 | 19 | Varón |
| C064 | 34 | Varón |
| C065 | 38 | Varón |

| Código | Edad (años) | Sexo |
|--------|-------------|-------|
| C220 | 21 | Varón |
| C221 | 25 | Varón |
| C222 | 21 | Varón |
| C223 | 25 | Varón |
| C224 | 25 | Varón |
| C225 | 22 | Varón |
| C226 | 19 | Varón |
| C227 | 19 | Varón |
| C228 | 22 | Varón |
| C229 | 19 | Varón |
| C230 | 21 | Varón |
| C231 | 18 | Varón |
| C232 | 19 | Varón |
| C233 | 21 | Varón |
| C234 | 19 | Varón |
| C235 | 19 | Varón |
| C236 | 19 | Varón |
| C237 | 19 | Varón |
| C238 | 22 | Varón |
| C239 | 21 | Varón |
| C240 | 20 | Varón |
| C241 | 25 | Varón |
| C242 | 19 | Varón |
| C243 | 21 | Varón |
| C244 | 22 | Varón |
| C245 | 25 | Varón |
| C246 | 23 | Varón |
| C247 | 22 | Varón |
| C248 | 19 | Varón |
| C249 | 19 | Varón |
| C250 | 22 | Varón |
| C251 | 28 | Varón |
| C252 | 28 | Varón |
| C253 | 28 | Varón |
| C254 | 28 | Varón |
| C255 | 26 | Varón |
| C256 | 26 | Varón |
| C257 | 26 | Varón |
| C258 | 26 | Varón |
| C259 | 28 | Varón |
| C260 | 28 | Varón |
| C261 | 28 | Varón |
| C262 | 28 | Varón |
| C263 | 28 | Varón |
| C264 | 26 | Varón |
| C265 | 28 | Varón |

| Código | Edad (años) | Sexo |
|--------|-------------|-------|
| C066 | 35 | Varón |
| C067 | 30 | Varón |
| C068 | 27 | Varón |
| C069 | 32 | Varón |
| C070 | 37 | Varón |
| C071 | 26 | Varón |
| C072 | 26 | Varón |
| C073 | 36 | Varón |
| C074 | 26 | Varón |
| C075 | 23 | Varón |
| C076 | 29 | Varón |
| C077 | 34 | Varón |
| C078 | 31 | Varón |
| C079 | 28 | Varón |
| C080 | 30 | Varón |
| C081 | 26 | Varón |
| C082 | 35 | Varón |
| C083 | 30 | Varón |
| C084 | 39 | Varón |
| C085 | 28 | Varón |
| C086 | 28 | Varón |
| C087 | 33 | Varón |
| C088 | 36 | Varón |
| C089 | 35 | Varón |
| C090 | 27 | Varón |
| C091 | 18 | Varón |
| C092 | 28 | Varón |
| C093 | 33 | Varón |
| C094 | 33 | Varón |
| C095 | 29 | Varón |
| C096 | 39 | Varón |
| C097 | 30 | Varón |
| C098 | 24 | Varón |
| C099 | 39 | Varón |
| C100 | 31 | Varón |
| C101 | 22 | Varón |
| C102 | 18 | Varón |
| C103 | 32 | Varón |
| C104 | 30 | Varón |
| C105 | 39 | Varón |
| C106 | 34 | Varón |
| C107 | 20 | Varón |
| C108 | 33 | Varón |
| C109 | 35 | Varón |
| C110 | 37 | Varón |
| C111 | 20 | Varón |

| Código | Edad (años) | Sexo |
|--------|-------------|-------|
| C266 | 28 | Varón |
| C267 | 33 | Varón |
| C268 | 31 | Varón |
| C269 | 30 | Varón |
| C270 | 33 | Varón |
| C271 | 28 | Varón |
| C272 | 28 | Varón |
| C273 | 26 | Varón |
| C274 | 28 | Varón |
| C275 | 28 | Varón |
| C276 | 34 | Varón |
| C277 | 31 | Varón |
| C278 | 30 | Varón |
| C279 | 28 | Varón |
| C280 | 32 | Varón |
| C281 | 29 | Varón |
| C282 | 30 | Varón |
| C283 | 33 | Varón |
| C284 | 33 | Varón |
| C285 | 31 | Varón |
| C286 | 32 | Varón |
| C287 | 28 | Varón |
| C288 | 32 | Varón |
| C289 | 35 | Varón |
| C290 | 31 | Varón |
| C291 | 31 | Varón |
| C292 | 35 | Varón |
| C293 | 31 | Varón |
| C294 | 33 | Varón |
| C295 | 35 | Varón |
| C296 | 35 | Varón |
| C297 | 35 | Varón |
| C298 | 31 | Varón |
| C299 | 30 | Varón |
| C300 | 31 | Varón |
| C301 | 32 | Varón |
| C302 | 33 | Varón |
| C303 | 28 | Varón |
| C304 | 35 | Varón |
| C305 | 34 | Varón |
| C306 | 34 | Varón |
| C307 | 28 | Varón |
| C308 | 34 | Varón |
| C309 | 34 | Varón |
| C310 | 30 | Varón |
| C311 | 33 | Varón |

| Código | Edad (años) | Sexo |
|--------|-------------|-------|
| C112 | 33 | Varón |
| C113 | 26 | Varón |
| C114 | 25 | Varón |
| C115 | 33 | Varón |
| C116 | 33 | Varón |
| C117 | 36 | Varón |
| C118 | 33 | Varón |
| C119 | 26 | Varón |
| C120 | 25 | Varón |
| C121 | 39 | Varón |
| C122 | 34 | Varón |
| C123 | 39 | Varón |
| C124 | 31 | Varón |
| C125 | 33 | Varón |
| C126 | 39 | Varón |
| C127 | 26 | Varón |
| C128 | 30 | Varón |
| C129 | 33 | Varón |
| C130 | 39 | Varón |
| C131 | 37 | Varón |
| C132 | 23 | Varón |
| C133 | 32 | Varón |
| C134 | 25 | Varón |
| C135 | 39 | Varón |
| C136 | 19 | Varón |
| C137 | 39 | Varón |
| C138 | 23 | Varón |
| C139 | 21 | Varón |
| C140 | 37 | Varón |
| C141 | 21 | Varón |
| C142 | 25 | Varón |
| C143 | 20 | Varón |
| C144 | 35 | Varón |
| C145 | 36 | Varón |
| C146 | 33 | Varón |
| C147 | 20 | Varón |
| C148 | 27 | Varón |
| C149 | 27 | Mujer |
| C150 | 24 | Mujer |
| C151 | 24 | Mujer |
| C152 | 26 | Mujer |
| C153 | 28 | Mujer |
| C154 | 18 | Mujer |
| C155 | 25 | Mujer |
| C156 | 18 | Mujer |
| C157 | 18 | Mujer |

| Código | Edad (años) | Sexo |
|--------|-------------|-------|
| C312 | 34 | Varón |
| C313 | 34 | Varón |
| C314 | 34 | Varón |
| C315 | 34 | Varón |
| C316 | 34 | Varón |
| C317 | 34 | Varón |
| C318 | 34 | Varón |
| C319 | 34 | Varón |
| C320 | 33 | Varón |
| C321 | 31 | Varón |
| C322 | 28 | Varón |
| C323 | 31 | Varón |
| C324 | 28 | Varón |
| C325 | 33 | Varón |
| C326 | 34 | Varón |
| C327 | 33 | Varón |
| C328 | 29 | Varón |
| C329 | 35 | Varón |
| C330 | 33 | Varón |
| C331 | 32 | Varón |
| C332 | 35 | Varón |
| C333 | 34 | Varón |
| C334 | 33 | Varón |
| C335 | 31 | Varón |
| C336 | 28 | Varón |
| C337 | 28 | Varón |
| C338 | 28 | Varón |
| C339 | 29 | Varón |
| C340 | 29 | Varón |
| C341 | 28 | Varón |
| C342 | 28 | Varón |
| C343 | 28 | Varón |
| C344 | 34 | Varón |
| C345 | 33 | Varón |
| C346 | 35 | Varón |
| C347 | 37 | Varón |
| C348 | 36 | Varón |
| C349 | 37 | Varón |
| C350 | 38 | Varón |
| C351 | 20 | Mujer |
| C352 | 18 | Mujer |
| C353 | 22 | Mujer |
| C354 | 18 | Mujer |
| C355 | 21 | Mujer |
| C356 | 20 | Mujer |
| C357 | 18 | Mujer |

| Código | Edad (años) | Sexo |
|--------|-------------|-------|
| C158 | 32 | Mujer |
| C159 | 19 | Mujer |
| C160 | 28 | Mujer |
| C161 | 19 | Mujer |
| C162 | 18 | Mujer |
| C163 | 25 | Mujer |
| C164 | 24 | Mujer |
| C165 | 27 | Mujer |
| C166 | 28 | Mujer |
| C167 | 24 | Mujer |
| C168 | 23 | Mujer |
| C169 | 23 | Mujer |
| C170 | 22 | Mujer |
| C171 | 22 | Mujer |
| C172 | 29 | Mujer |
| C173 | 23 | Mujer |
| C174 | 23 | Mujer |
| C175 | 22 | Mujer |
| C176 | 29 | Mujer |
| C177 | 21 | Mujer |
| C178 | 29 | Varón |
| C179 | 23 | Mujer |
| C180 | 20 | Mujer |
| C181 | 28 | Mujer |
| C182 | 28 | Mujer |
| C183 | 29 | Mujer |
| C184 | 27 | Mujer |
| C185 | 24 | Mujer |
| C186 | 19 | Mujer |
| C187 | 25 | Mujer |
| C188 | 24 | Mujer |
| C189 | 37 | Varón |
| C190 | 28 | Mujer |
| C191 | 21 | Mujer |
| C192 | 22 | Mujer |
| C193 | 25 | Mujer |
| C194 | 29 | Mujer |
| C195 | 20 | Mujer |
| C196 | 18 | Mujer |
| C197 | 19 | Mujer |
| C198 | 24 | Mujer |
| C199 | 26 | Mujer |
| C200 | 18 | Mujer |

| Código | Edad (años) | Sexo |
|--------|-------------|-------|
| C358 | 19 | Mujer |
| C359 | 19 | Mujer |
| C360 | 22 | Mujer |
| C361 | 25 | Mujer |
| C362 | 25 | Mujer |
| C363 | 25 | Mujer |
| C364 | 25 | Mujer |
| C365 | 22 | Mujer |
| C366 | 22 | Mujer |
| C367 | 23 | Mujer |
| C368 | 25 | Mujer |
| C369 | 19 | Mujer |
| C370 | 25 | Mujer |
| C371 | 18 | Mujer |
| C372 | 18 | Mujer |
| C373 | 21 | Mujer |
| C374 | 19 | Mujer |
| C375 | 20 | Mujer |
| C376 | 23 | Mujer |
| C377 | 20 | Mujer |
| C378 | 25 | Mujer |
| C379 | 26 | Mujer |
| C380 | 26 | Mujer |
| C381 | 26 | Mujer |
| C382 | 26 | Mujer |
| C383 | 28 | Mujer |
| C384 | 28 | Mujer |
| C385 | 26 | Mujer |
| C386 | 28 | Mujer |
| C387 | 28 | Mujer |
| C388 | 26 | Mujer |
| C389 | 28 | Mujer |
| C390 | 28 | Mujer |
| C391 | 29 | Mujer |
| C392 | 28 | Mujer |
| C393 | 31 | Mujer |
| C394 | 28 | Mujer |
| C395 | 29 | Mujer |
| C396 | 31 | Mujer |
| C397 | 30 | Mujer |
| C398 | 30 | Mujer |
| C399 | 35 | Mujer |
| C400 | 35 | Mujer |

ANEXO IV: SECUENCIAS DE LOS CEBADORES UTILIZADOS PARA EL CHIP DE GENOTIPADO

| Gen | Código rs | Secuencia del cebador común + cebador específico |
|--------|----------------------------------|--|
| ADRA2A | rs 1800544 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATGGCTGCTCCAGACGTAAGTCTC |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCGAGAGGCGGGTACCTTGAG |
| | rs 553668 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATACATCAAACCAAGGCCAAG |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCACTGGACTAC AAGGGCATGG |
| ADRB2 | rs 1042713, rs 1042714 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATCTTCTTGCTGGCACCAAT |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCCATGACCAGATCAGCACAG |
| | rs 1042717 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATCTGCAGACGGTCCACCACTA |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCATGGCAAAGTAGCGATCCAC |
| | rs 1042718 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATAGGCCTTACCTCCTTCTTGC |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCGATCACAGGGGAACGTAGA |
| | rs 1042719, rs 1042720 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATCTGCGCAGGTCTTCTTTGA |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCGGGGTCTTTAAAAGTAGAAAAA |
| AR | rs 6152 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATCAACTCCTTCAGCAACAGCA |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCGACACCGACACTGCCTTACA |
| ARRB2 | rs 1045280 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATAGGGACTAGTGAGGGGAGA |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCGTCTCTGTGCTTGAGTTTCC |
| | rs 7208257 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATGTTGGGATTACAGGCATGA |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCAGCTGTTCTCCCGTACCTT |
| BDNF | rs 6265 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATACTCTGGAGAGCGTGAATGG |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCAGAAGAGGAGGCTCCAAAGG |
| CHRNA4 | rs 1044393, rs 1044394 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATGCTGGACTTCTGGGAGAGTG |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCAGGGGATGATGAGGTTGATG |
| | rs 1044396, rs 1044397 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATCAATGCACATGCAAGAAGG |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCGGTGGTCTGCAATGTACTGG |
| | rs 2273505, rs 2273506 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATGCTGTCTGTTCTGACGTACCA |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCCTTCTCCGGTTACAACAAGTGG |
| | rs 2229959, rs 2229960 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATCATGCATAAGATGGCCAGTG |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCCTGGCTTCTCAGCTCCAG |
| CNR1 | rs 4707436 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATTAAGTGGAAAAAGGCCAACA |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCCCAGCTCTGTCTTGGTAGG |
| | rs 806368 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATCCGCTTGAAACATTGGAAAT |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCGTGTTGAGCAGTGGCCTACA |
| | rs 806369, rs 806370, rs 8063721 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATACAGCAGGGATATGGAGGAG |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCCTGAATAGCCACATTTTAAACAAA |
| | rs 806372 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATTGGGGGAGAGACAATCACT |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCAGGGCAGGGACTCTTCTTG |

| Gen | Código rs | Secuencia del cebador común + cebador específico |
|---|---|--|
| COMT | rs4680 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATGGGCCTACTGTGGCTACTCA |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCCCCTTTTCCAGGTCTGACA |
| DAT1 | rs2269272 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATTGGGGTGTGCTTTTGTTTTG |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCACACAGCTGCTACTGCCTGA |
| | rs3776581 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATAGGTCACCCCTTGAGTCTGA |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCGCAATTCCACAAAAGCTG |
| | rs2032893 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATATCCCTATCAGGGGCAGACT |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCATCGGGCATTCACAATGTTT |
| | rs6347 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATCCAGGGCTGATCTTCATCAT |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCGTC AAGGACAGGAGGTCTGG |
| | rs1042098 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATGCAAACGTCTGCTC ACTGC |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCGCCCTCCTTTCTCTCGAAAC |
| | rs27072 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATCTACTGTGAGCACGGGGATT |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCGCAGGGCAGAAAAACGTCTA |
| | rs3863145 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATCCAGGTTACCTGTGCATGACA |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCGGAAGGAGGAAAGAGCTGGA |
| | rs2652511 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATACTCACCTCGGTGCCTTCTA |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCGCACTCGCCTAAGAAAACCA |
| | rs40184 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATCTGATCAATACGCCCCAGAG |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCAGCAGCTGAAGGTGGCTAAG |
| rs11564774 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATCGAGAGAAAGGAGGGCAACT | |
| | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCAGGGAGCCTCACACAGACAG | |
| DBH | rs1611115 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATACAGGAGGAAAAGGAAGGA |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCACAGGACCTTTGCCATCATC |
| | rs2519152 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATGTCACACACCTCTCCCTGTA |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCCTCATCCGCTGTCCATCTTC |
| DDC | rs17133878 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATCCATGGTACTGCCTGTCA |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCGCTCCTTTTACTGGAATAG |
| | rs11765748 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATAATTGCTGCCATGCTAAACC |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCGTGAGCACATGCTTTTGAA |
| DRD5 | rs16888561 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATCGAGGAGGAGGAGATCCTT |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCGATCCATGAGGGGTTTCTT |
| | rs2227850 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATGCCATCATGATCGTGACCTA |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCAGGGACCATGCAGTTAAGGA |
| | rs2227842, rs2227843, rs2227845, rs2227847 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATCAAAC AACCTGGCCAAC TG |
| AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCCTTGGTCTCCTTCTTGATG | | |
| FADS2 | rs174611 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATCTGTCCAGGTGCCAATAGT |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCAAAATTCCAGGAGGGTGAA |

| Gen | Código rs | Secuencia del cebador común + cebador específico |
|--------|-----------|--|
| FADS2 | rs498793 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATCTGGGACTCTCTGAGCCTCT |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCCTAC AATC ACCAGC ACGAA |
| GRIN2A | rs8049651 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATAGCATTCTGCCACTCACTT |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCGTCTTCTCCGACTGTGAGC |
| GRIN2B | rs2300256 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATGCAGACATGGCAGAAAGTGA |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCC TGCATGCATTCATTC AAAAT |
| | rs2284411 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATCATCCTTGGTTGAAACCATTTT |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCCGTAAGATGGGGACCTCTTG |
| | rs2268115 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATCCCACATTTCCAGTTGAAGG |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCACCTTAGGCAGAGGTGTGA |
| | rs2284407 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATCATTCCATCCTTTGCCAGT |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCC TGTGGAGACAGCTGGAAGA |
| HTR1B | rs6296 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATCTCCCGATTTTGAACAGA |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCC TGATCCCTAGGGTCTTGGTG |
| HTR2A | rs6311 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATGGCTGAAGGGTGAAGAGAGA |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCCTAGCCACCCTGAGCCTATG |
| | rs6313 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATCAAGGTGAATGGTGAGCAGA |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCAGGAAAGGTTGGTTTCGATT |
| | rs6314 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATCAAAGCAAGATGCCAAGACA |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCAGTGTGCCTCCACAGTTG |
| MAOA | rs6323 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATCCACAAAGACTGCAGCTCAC |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCC TCCAGAAGGCCTCCTTGAAT |
| NGF | rs6330 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATCCTTGGGAGGTC AACTCTGA |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCAGTGTC AAGGGAATGCTGA |
| PNMT | rs897453 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATGGTTGTTGCTCCCGTGAAT |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCGGAAGTTCAGGAGCAGGATG |
| | rs7946 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATTACCATGGCCACTCTGACCT |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCC TGACCTGCCTCTGTCCTTTC |
| SLC6A2 | rs998424 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATGCCCCAGTTCTAAGGCTAGG |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCCTGGCAGATGACTTCCAGGT |
| | rs3785157 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATCCTTATGGCCACAGAGAAGC |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCCTCTATAAGGGATCCACTCTTACTCA |
| | rs5569 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATTCAGGGAGACCCTAATTCC |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCC TTGACTTTATTGAAATGCGGC |
| SLC6A4 | rs1042173 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATAAAGTGCAGAGAGAACAGG |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCC AAGCTTGCATGACACACT |
| | rs2228673 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATGGGATTGGTTATGCCATCTG |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCGAGGGTCCAGGTGATGTTGT |

| Gen | Código rs | Secuencia del cebador común + cebador específico | |
|------------|---|---|---|
| SLC6A4 | rs28914828 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATAGCAGTTCC AAGTCCTGGTG | |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCC TCCACAGC ATAGCCAATCAC | |
| | rs6354 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATC ACCCCAGCATCAGTAACCT | |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCC ACTGCTGCTCACCATTGT | |
| SNAP25 | rs363006 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATATGCCCGAGAAAATGAAATG | |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCCTGAATCCAAGTCTGTGTT | |
| | rs362567 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAAT TGCTCTGGTCCTTAGTTGCC | |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCC TGAGTCTCCTAATGGTGCCCTG | |
| | rs3746544 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATACACATCAGTCCACCCATT | |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCC ACCGAGGAGAGAAAATGA | |
| | rs6077690 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATCCTCCTCCATTCC TTCACAA | |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCGAATAGGGGAAAGGGGTTT | |
| | rs363020 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATTTTTAGCTGGATTAAAACGTTGA | |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCC CCCAGGAGTGATTACAGG | |
| | rs3787283 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATAGGGCTGCTACCAGCATAAA | |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCAGTTTGGTTTCCCACACTG | |
| | SYP | rs2293945 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATCCCGATATCCCTCCCTTTA |
| | | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCC TGAAGGAGCCAATCAAGAGG |
| rs17855914 | | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATGCCGGACTGTACTGTTTCC | |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCGATGTGAAGATGGCCACAGA | |
| rs5906754 | | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATGTTAGCACAGGGCCCAATAA | |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCCATGGGAGGGATTGAGTA | |
| rs3817678 | | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATTTCTCTTTAAGGCCCAGCA | |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCGGTCAGACGAGCTCACC AAT | |
| TPH2 | rs1843809 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATATTTTCTTTTGGGGGCTGT | |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCCATGAGGTTCATGGGCTACC | |
| | rs1386493 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATGAAATTC CAGTCGCCAATA | |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCAGTGAAATGGGTGGGTGAAT | |
| | rs4565946 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATGTGTCCATACAGTGCCAACG | |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCAGGGGA ACTGAGGTCCAGAT | |
| | rs1386497 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAAT TGTGAGGAGGCTAAGGGAGA | |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCATGCATGGTATCCAACAGG | |
| rs4570625 | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAAT TGCATAGAGGCATCACAGGA | | |
| | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCC TCTTATCCCTCCCATCAGCA | | |

SECUENCIAS DE LOS CEBADORES COMUNES

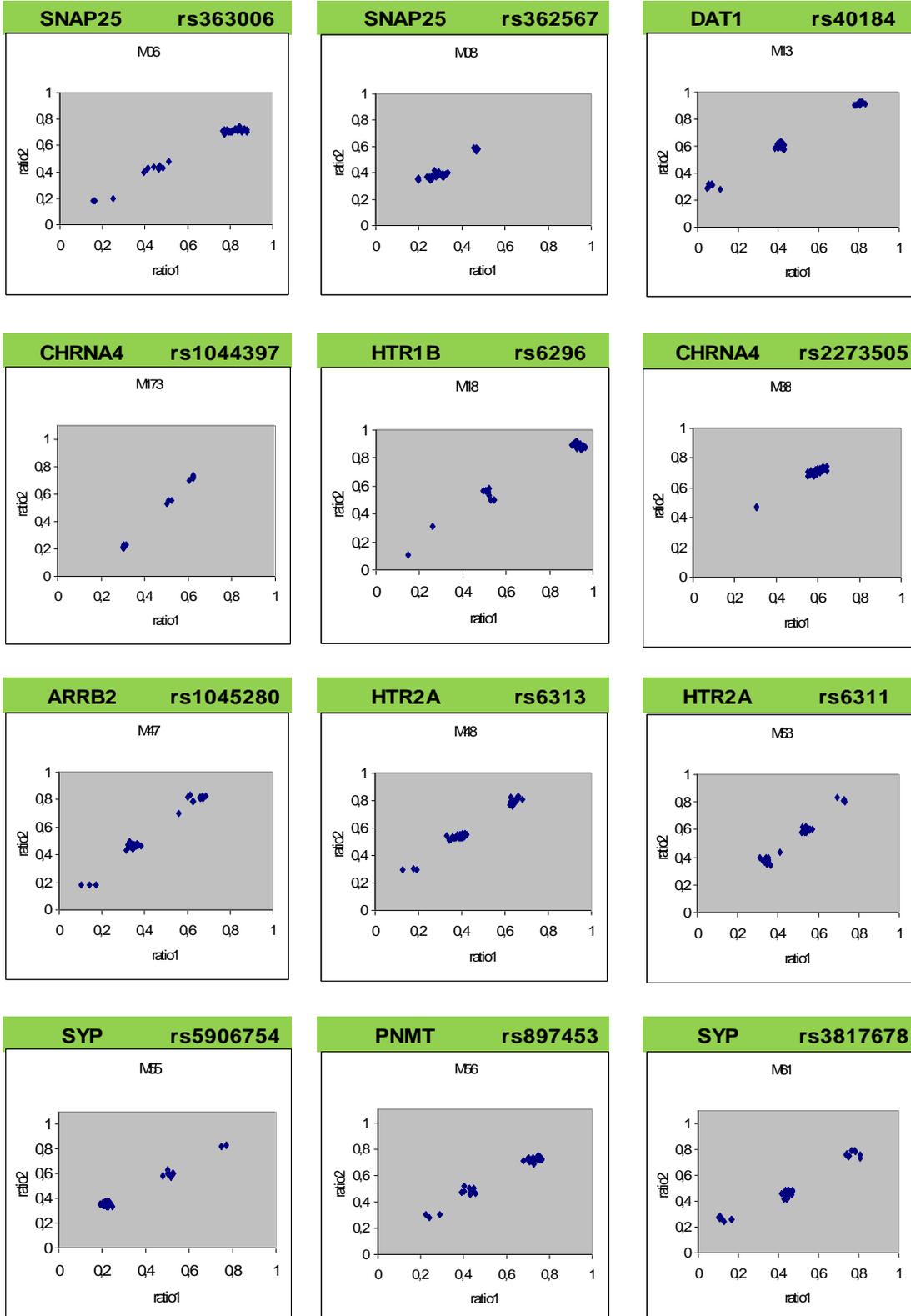
| | |
|------------------------------|----------------------------|
| Cebador común forward (25nt) | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAAT |
| Cebador común reverse (26nt) | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCC |

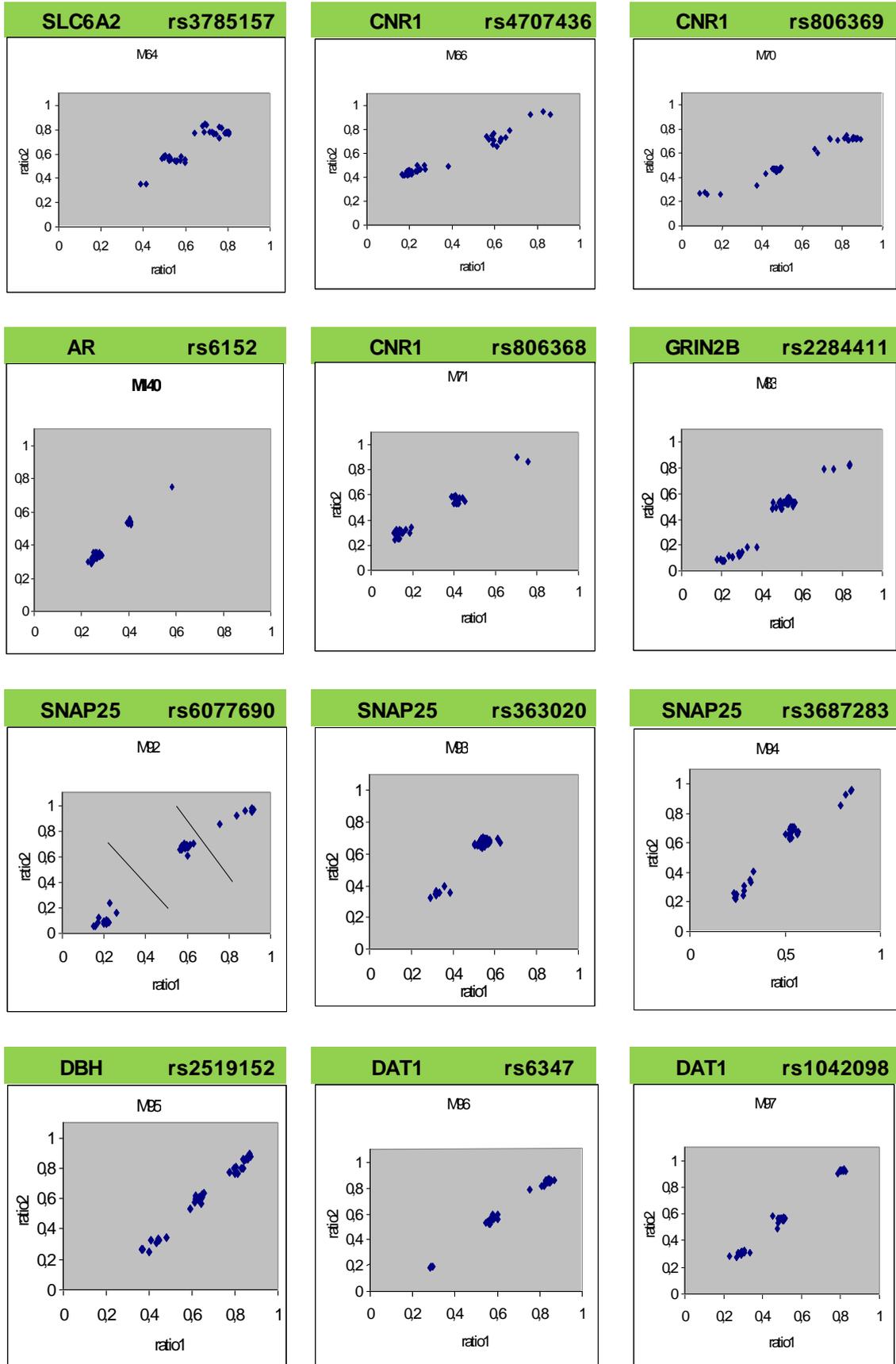
SECUENCIAS DE LOS CEBADORES UTILIZADOS PARA EL KIT DE DETECCIÓN DE REORDENAMIENTOS GENÓMICOS Y VNTRS

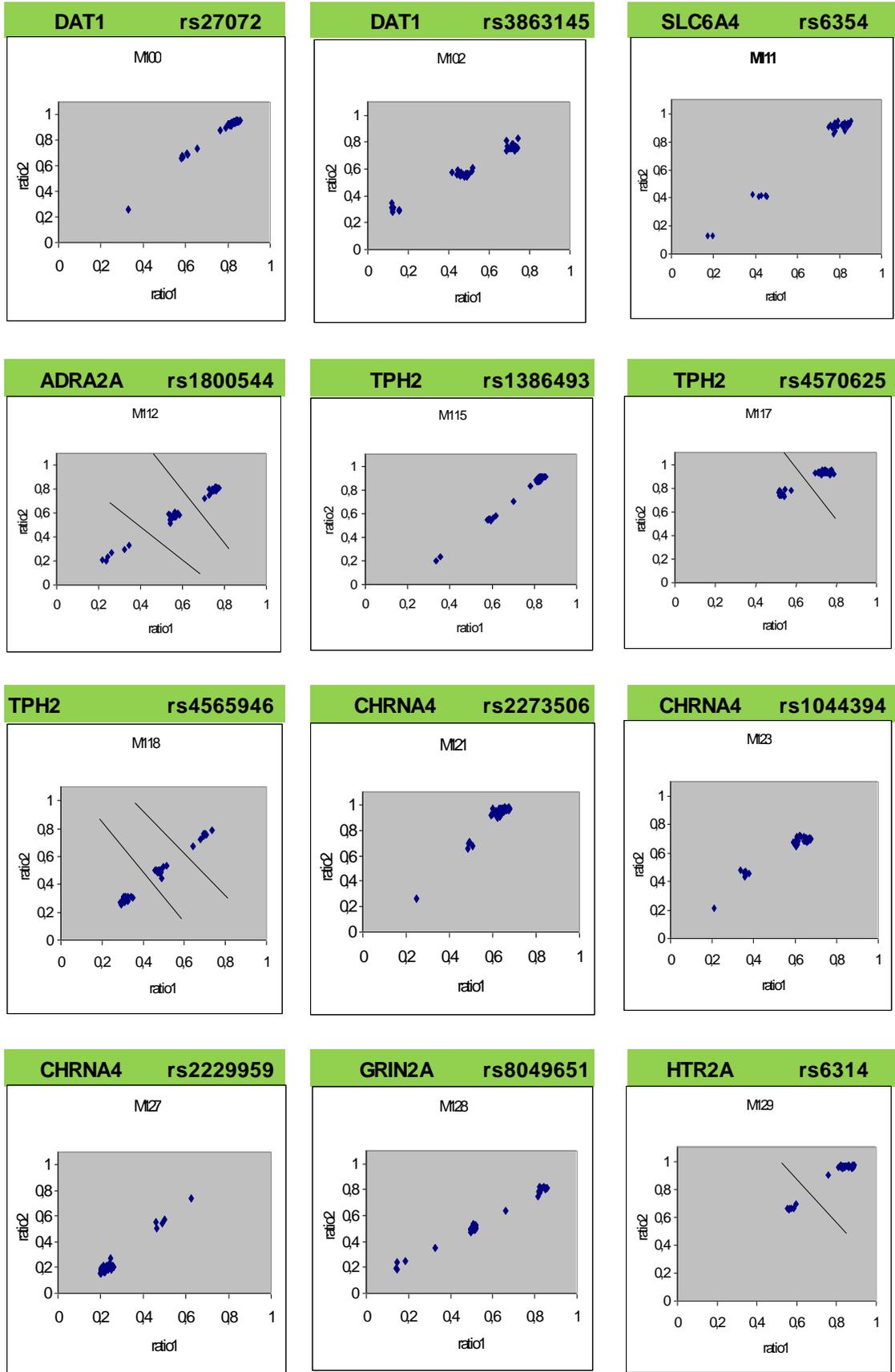
| Gen | Reord. | Secuencia del cebador común+ cebador específico |
|--------|--------------|--|
| DRD4 | Ins 120bp | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATGTTGTCTGTCTTTTCTCATTGTTCCATTG |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCGAAGGAGCAGGCACCGTGAGC |
| SLC6A4 | Ins 44pb | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATAGGGGAGATCCTGGGAGAG |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCGCCAGCACCTAACCCCTAAT |
| DRD4 | VNTR 48pb | CTTCCTACCCTGCCCGCTCATGCTGCTGCTCTACTGG |
| | | ACCACCACCGGCAGGACCCTCATGGCCTTGCGCTC |
| SLC6A3 | VNTR 40pb | GGCGTACCTTCGCGGCAGATATAATCATTGCGAAACATAAAAAC TGTGT |
| | | AACTGAGCCGTAGCCACTGTCTGTCCTGCGGTGTAGGGAACGGCC |

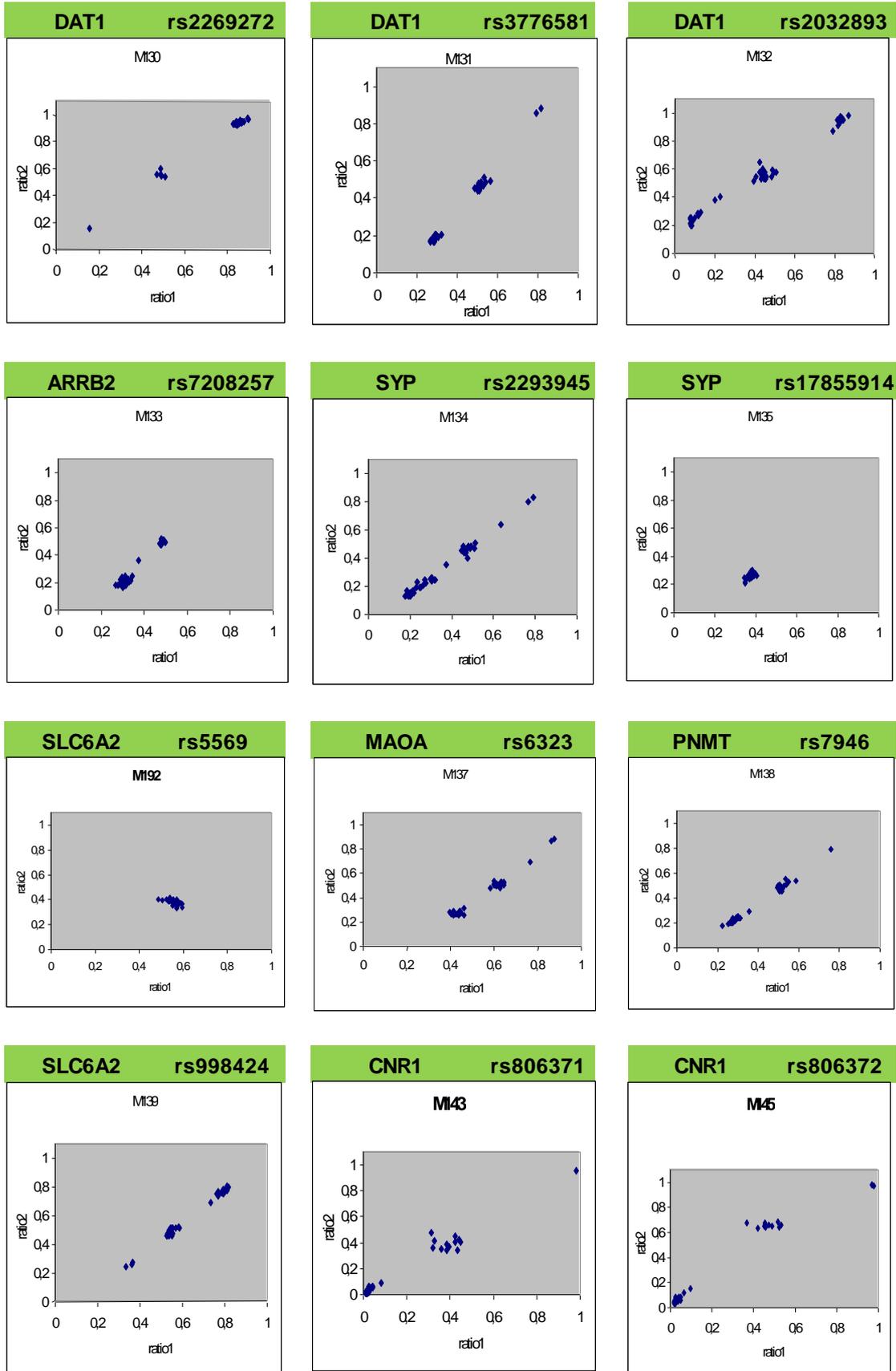
ANEXO V: OPTIMIZACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS Y VALIDACIÓN TÉCNICA DEL CHIP DE GENOTIPADO

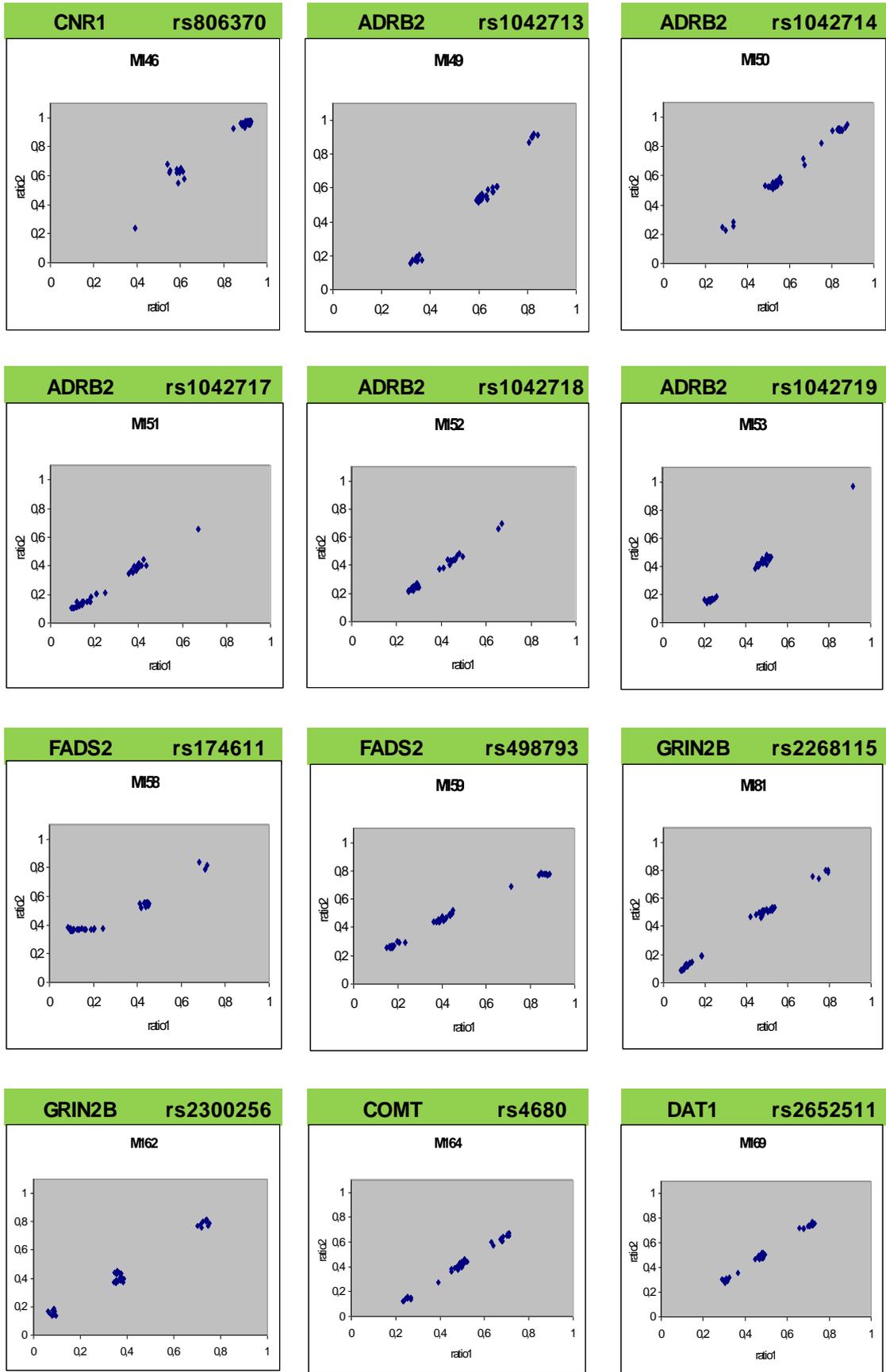
A) Datos representados en gráficas de los resultados para la detección de los 84 polimorfismos que forman el chip de genotipado tras la optimización de los oligonucleótidos de detección. Cada gráfica muestra los tres grupos posibles para cada uno de los SNPs, en los casos en que se disponía de muestra de cada uno de los genotipos.

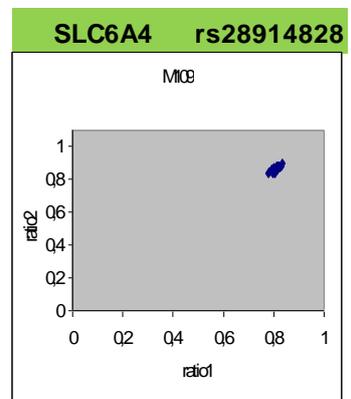
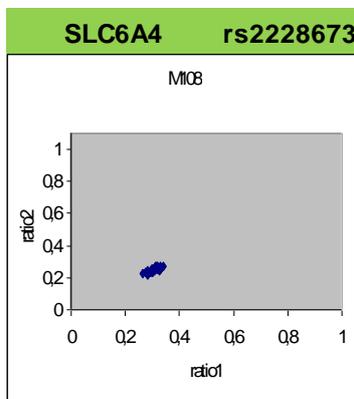
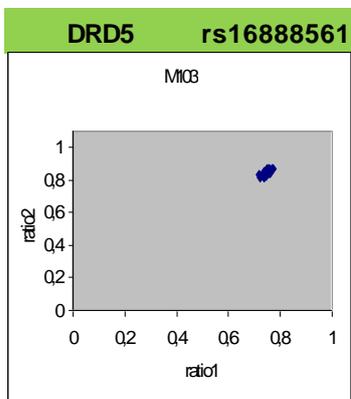
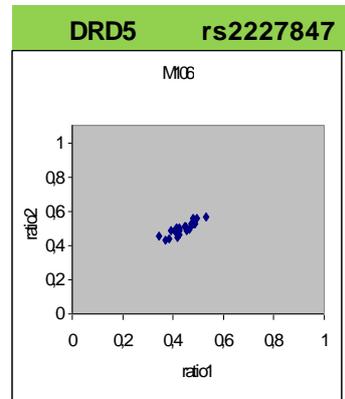
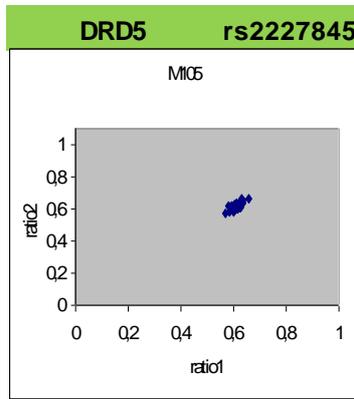
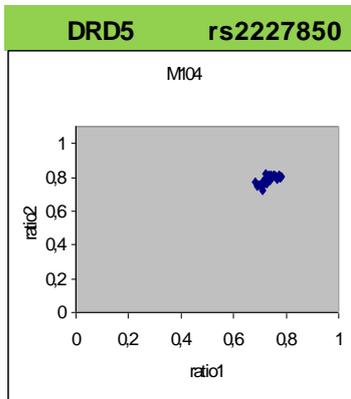
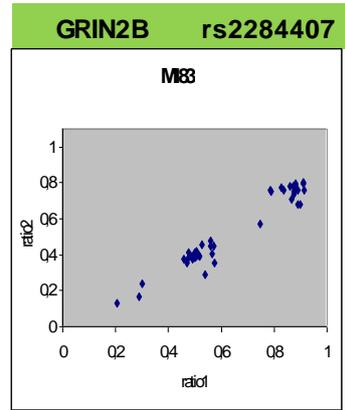
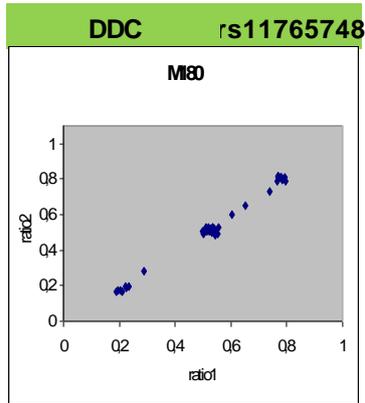
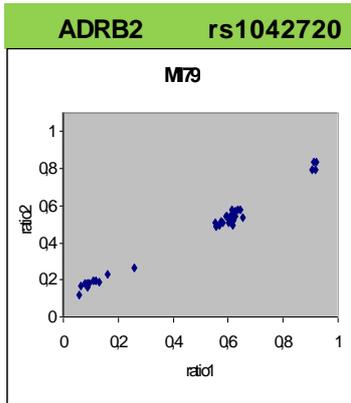
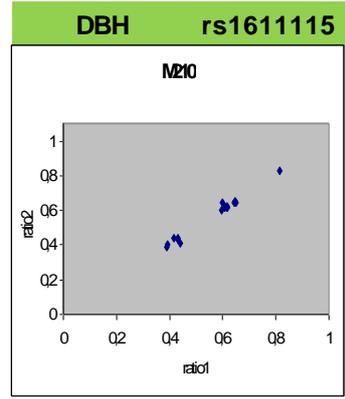
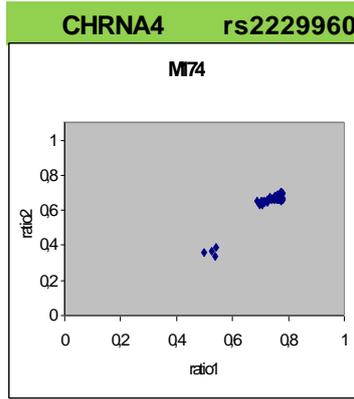
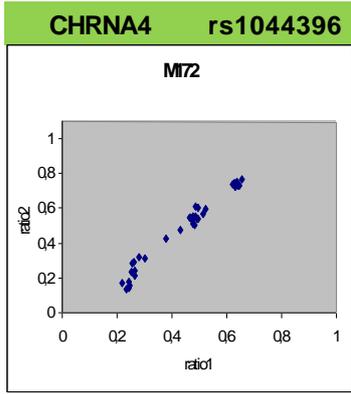


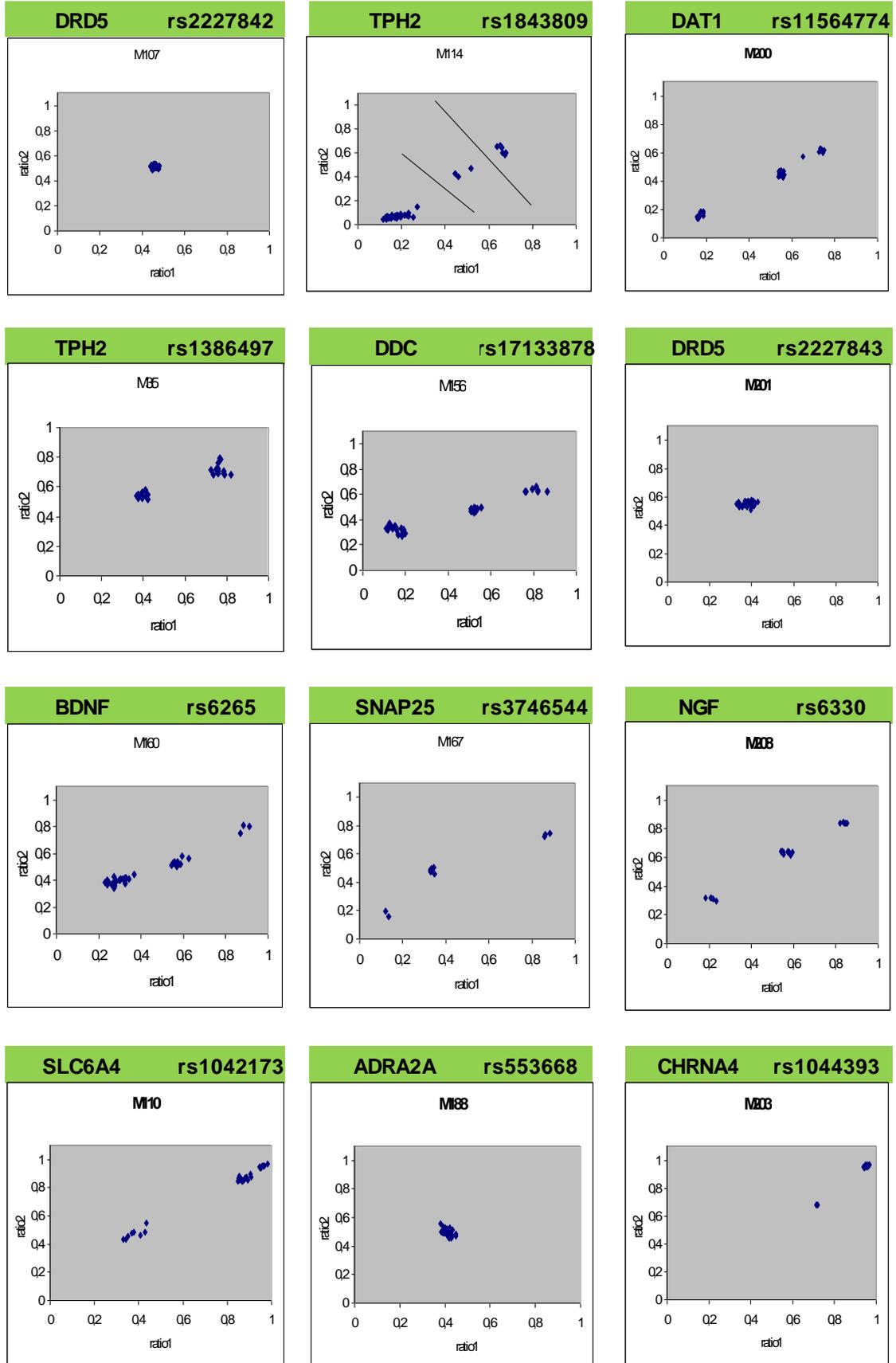












B) Secuencias de los oligonucleótidos de detección optimizados para cada uno de los 84 polimorfismos que se genotiparon mediante el chip de genotipado en el desarrollo del estudio piloto.

| Oligonucleótidos Controles de Hibridación | |
|---|---------------------|
| CONTROL EXTERNO NORMAL | CTTGACGACTCCTGAACGG |
| CONTROL EXTERNO MUTANTE | CTTGACGACACCTGAACGG |

| Gen | Código rs | Secuencia del oligonucleótido |
|---------------|-----------|--|
| ADRA2A | rs1800544 | CCGTCGGCCCCGAGCTGCATG CCGTCGGCCCCGGAGCTGCATG CGTCGGCCCCGAGCTGCAT CGTCGGCCCCGGAGCTGCAT |
| ADRA2A | rs553668 | TCTCTCTTTTTGAAGAAAAATGC TCTCTCTTTTTAAAGAAAAATGC TCTCTCTTTTTGAAGAAAAATGC TCTCTCTTTTTAAAGAAAAATGC |
| ADRB2 | rs1042713 | GCATGGCTTCTATTGGGTGCC GCATGGCTTCCATTGGGTGCC CATGGCTTCTATTGGGTGC CATGGCTTCCATTGGGTGC |
| ADRB2 | rs1042714 | CTCGTCCCTTTGCTGCGTGACGT CTCGTCCCTTTCCTGCGTGACGT TCGTCCCTTTGCTGCGTGACG TCGTCCCTTTCCTGCGTGACG |
| ADRB2 | rs1042717 | GTCATGGGCCTAGCAGTGGTGCC GTCATGGGCCTGGCAGTGGTGCC TCATGGGCCTAGCAGTGGTGC TCATGGGCCTGGCAGTGGTGC |
| ADRB2 | rs1042718 | ACTGGTACAGGGCCACC ACTGGTACGGGCCACC CACTGGTACAGGGCCACCC CACTGGTACGGGCCACCC |
| ADRB2 | rs1042719 | GAGTAGCCATTGCCATAGGCCTT GAGTAGCCATTCCCATAGGCCTT AGTAGCCATTGCCATAGGCCT AGTAGCCATTCCCATAGGCCT |
| ADRB2 | rs1042720 | TGACTCACTGCTATAAAGCAGTTTT TGACTCACTGCTGTAAGCAGTTTT ATGACTCACTGCTATAAAGCAGTTTT ATGACTCACTGCTGTAAGCAGTTTT |

| Gen | Código rs | Secuencia del oligonucleótido |
|--------|-----------|--|
| AR | rs6152 | GCCCCGAGGCTTCCCTCGCTCT GCCCCGAGGCCTCCCTCGCTCT CCCCCGAGGCTTCCCTCGCTC CCCCCGAGGCCTCCCTCGCTC |
| ARRB2 | rs1045280 | CCACTGCTCAGCGACAACCGGGA TCCCGTTGTCGCTGAGCAGTGG CCACTGCTCAGTGACAACCGGGA TCCCGTTGTCAGTACTGAGCAGTGG |
| ARRB2 | rs7208257 | AAGTCTTCTCCTTCCCTCCGCC AAGTCTTCTCTTTCCCTCCGCC AAGTCTTCTCCTTCCCTCCGCC AAGTCTTCTCTTTCCCTCCGCC |
| BDNF | rs6265 | CTCTTCTATCATGTGTTGAAAG CTCTTCTATCACGTGTTGAAAG GCTCTTCTATCATGTGTTGAAAGT GCTCTTCTATCACGTGTTGAAAGT |
| CHRNA4 | rs1044393 | GATCTCGGCGTCCACGATGACCC GATCTCGGCATCCACGATGACCC ATCTCGGCGTCCACGATGACC ATCTCGGCATCCACGATGACC |
| CHRNA4 | rs1044394 | TACGAGTGCTGCGCCGAGATCTA TACGAGTGCTGTGCCGAGATCTA AGATCTCGGCGCAGCACTCGT AGATCTCGGCACAGCACTCGT |
| CHRNA4 | rs1044396 | GTCCCCGAGCGCCACGGTC GTCCCCGAGTGCCACGGTC TCCCCGAGCGCCACGGT TCCCCGAGTGCCACGGT |
| CHRNA4 | rs1044397 | TGCGGGGGCGGTGCTTTGGTGCT TGCGGGGGCGGCGCTTTGGTGCT GTGCGGGGGCGGTGCTTTGGTGCTG GTGCGGGGGCGGCGCTTTGGTGCTG |
| CHRNA4 | rs2273505 | GTCACAGCGCACGATGGCCACGC GCGTGGCCATCGTGCGCTGTGAC GTCACAGCGCATGATGGCCACGC GCGTGGCCATCATGCGCTGTGAC |
| CHRNA4 | rs2273506 | GACGTGGTCCTTGCCGCTTCGG GACGTGGTCCTCGTCCGCTTCGG ACGTGGTCCTTGCCGCTTCG |

| Gen | Código rs | Secuencia del oligonucleótido |
|--------------------|-----------|---|
| CHRNA4 | rs2273506 | ACGTGGTCCTCGTCCGCTTCG |
| CHRNA4 | rs2229959 | ACGGTGAGGGCGGGTGCAGGC ACGGTGAGGGAGGGTGCAGGC CGGTGAGGGCGGGTGCAGG CGGTGAGGGAGGGTGCAGG |
| CHRNA4 | rs2229960 | TCCAGGGGGACGCAGAAGGACGG TCCAGGGGGACACAGAAGGACGG CCAGGGGGACGCAGAAGGACG CCAGGGGGACACAGAAGGACG |
| CNR1 | rs4707436 | GCACCCATGGCACCATTAAAGGAG CTCCTTAATGGTGCCATGGGTGC GCACCCATGGCGCCATTAAAGGAG CTCCTTAATGGCGCCATGGGTGC |
| CNR1 | rs806368 | AAACTCTCCCACCCGAAAATTAC AAACTCTCCCATCCGAAAATTAC GTAATTTTCGGGTGGGAGAGTTT GTAATTTTCGGATGGGAGAGTTT |
| CNR1 | rs806369 | TGATAGTCCCCCTCATGAGCAGG CCTGCTCATGAGGGGGACTATCA TGATAGTCCCCCTCATGAGCAGG CCTGCTCATGAAGGGGACTATCA |
| CNR1 | rs806370 | GTTCTCTGGCTGTTTATTTTGA GTTCTCTGGCTATTTATTTTGA TTCTCTGGCTGTTTATTTTGA TTCTCTGGCTATTTATTTTGA |
| CNR1 | rs806371 | ACTATTTATAAATGTTTGTAAAATG ACTATTTATAAATTTTGTAAAATG CATTTTAAACAAACATTTATAAATAGT CATTTTAAACAAAAATTTATAAATAGT |
| CNR1 | rs806372 | TATTGTTAGTTGAACATTTTAA TATTGTTAGTTCAACATTTTAA TTATTGTTAGTTGAACATTTTAA TTATTGTTAGTTCAACATTTTAA |
| COMT | rs4680 | CTTGTCTTCACGCCAGCGAAAT CTTGTCTTCATGCCAGCGAAAT TTGTCTTCACGCCAGCGAAA TTGTCTTCATGCCAGCGAAA |
| DAT1/SLC6A3 | rs2269272 | ATAACCTCATTGACAGTGCTTC ATAACCTCATTAAACAGTGCTTC |

| Gen | Código rs | Secuencia del oligonucléotido |
|-------------|------------|--|
| DAT1/SLC6A3 | rs2269272 | TAACCTCATTGACAGTGTCTT TAACCTCATTAACAGTGTCTT |
| DAT1/SLC6A3 | rs3776581 | GGCTTCTCAAATTGACTGCAGAG GGCTTCTCAAAGTACTGCAGAG GCTTCTCAAATTGACTGCAGA GCTTCTCAAAGTACTGCAGA |
| DAT1/SLC6A3 | rs2032893 | ATAAATAAATATACAGAAGCATTGG ATAAATAAATATGCAGAAGCATTGG AATGCTTCTGTATATTTATTT AATGCTTCTGCATATTTATTT |
| DAT1/SLC6A3 | rs6347 | CCTCTGTCCTCAGCCTGGGCCGT CCTCTGTCCTCGGCCTGGGCCGT CTCTGTCCCTCAGCCTGGGCCG CTCTGTCCCTCGGCCTGGGCCG |
| DAT1/SLC6A3 | rs1042098 | TCTCCCATTGCGGGATGACTTCC TCTCCCATTGCAGGATGACTTCC CTCCCATTGCGGGATGACTTC CTCCCATTGCAGGATGACTTC |
| DAT1/SLC6A3 | rs27072 | CCTGCTCCCAGCTCTGAGG CCTGCTCCCAGCTCTGAGG CTGCTCCCAGCTCTGAG CTGCTCCCAGCTCTGAG |
| DAT1/SLC6A3 | rs3863145 | ACATCCACTACGCTCCCATGC ACATCCACTATGCTCCCATGC TGCATGGGAGCGTAGTGGATGTG TGCATGGGAGCATAGTGGATGTG |
| DAT1/SLC6A3 | rs2652511 | CCTTGGCGGCCCGGGGCTCCAT ATGGAGCCCCCGGGCCGCAAGG CCTTGGCGGCCTGGGGGCTCCAT ATGGAGCCCCCAGGCCGCAAGG |
| DAT1/SLC6A3 | rs40184 | TTGATTTGTAGAAGTTTGAGTGA TCACTCAAACCTCTACAAATCAA TTGATTTGTAGGAGTTTGAGTGA TCACTCAAACCTCTACAAATCAA |
| DAT1/SLC6A3 | rs11564774 | CCACCCCGTTCTTGTCCCTGC CCACCCCGTTGTTGTCCCTGC TCCACCCCGTTCTTGTCCCTGCA TCCACCCCGTTGTTGTCCCTGCA |
| DBH | rs1611115 | TGTCTCTCCCGCAAGTAGACTG |

| Gen | Código rs | Secuencia del oligonucléotido |
|------|------------|--|
| DBH | rs1611115 | TGTCCTCTCCCACAAGTAGACTG TGTCCTCTCCCGCAAGTAGACTG TGTCCTCTCCCACAAGTAGACTG |
| DBH | rs2519152 | TGAGCCCCTCGAGGTCCTGTCCC TGAGCCCCTCGGGGTCCTGTCCC GAGCCCCTCGAGGTCCTGTCC GAGCCCCTCGGGGTCCTGTCC |
| DDC | rs17133878 | AACACCGGGACACTGGAGACT AACACCGGGATACTGGAGACT AAGTCTCCAGTGTCCTGGTGTTT AAGTCTCCAGTATCCCGGTGTTT |
| DDC | rs11765748 | TGTGCCTATAGTCTTGCTGGATT TGTGCCTATAGACTTGCTGGATT GTGCCTATAGTCTTGCTGGAT GTGCCTATAGACTTGCTGGAT |
| DRD5 | rs16888561 | AGTCCAGCTCTCAGACAGACT AGTCCAGCTCCCAGACAGACT GTCCAGCTCTCAGACAGAC GTCCAGCTCCCAGACAGAC |
| DRD5 | rs2227850 | GCCTGCGCGCTTCCATCAA GCCTGCGCGTTTCCATCAA TTGATGGAAGCGCGCAGGC TTGATGGAACGCGCAGGC |
| DRD5 | rs2227842 | GGCAGCTCTGCGCGTGCTCTGCG GGCAGCTCTGCACGTGCTCTGCG GCAGCTCTGCGCGTGCTCTGC GCAGCTCTGCACGTGCTCTGC |
| DRD5 | rs2227843 | TCGCTCATCAACTTCTACATC TCGCTCATCAGCTTCTACATC GATGTAGAAGTTGATGAGCGA GATGTAGAAGCTGATGAGCGA |
| DRD5 | rs2227845 | GGGCTCCCAAACGTCTCTCCC GGGCTCCCAAAGTCTCTCCC GGCTCCCAAACGTCTCTCC GGCTCCCAAAGTCTCTCC |
| DRD5 | rs2227847 | ACCTACACGCACATCTACCGC ACCTACACGCGCATCTACCGC GCGGTAGATGTGCGGTAGGT GCGGTAGATGCGCGGTAGGT |

| Gen | Código rs | Secuencia del oligonucléotido |
|---------------|-----------|--|
| FADS2 | rs174611 | CACGTCCTGGACCCTGAGATGCT CACGTCCTGGATCCTGAGATGCT GCATCTCAGGGTCCAGGACGT GCATCTCAGGATCCAGGACGT |
| FADS2 | rs498793 | CCCTCAGCCTGTGTTACAGGCCT CCCTCAGCCTGCGTTACAGGCCT CCCCTCAGCCTGTGTTACAGGCCTG CCCCTCAGCCTGCGTTACAGGCCTG |
| GRIN2A | rs8049651 | CACGTCTCGGTCAGGGGGTCTAT CACGTCTCGGTTAGGGGGTCTAT ACGTCTCGGTCAGGGGGTCTA ACGTCTCGGTTAGGGGGTCTA |
| GRIN2B | rs2300256 | GTCTCTGTTTCCTAACTCTTAGGAAA GTCTCTGTTTCCTGACTCTTAGGAAA TTTCCTAAGAGTTAGGAACAGAGAC TTTCCTAAGAGTCAGGAACAGAGAC |
| GRIN2B | rs2284411 | CTCTTGGTCCACTTGATGCTCTC GAGAGCATCAAGTGGACCAAGAG CTCTTGGTCCATTGATGCTCTC GAGAGCATCAAATGGACCAAGAG |
| GRIN2B | rs2268115 | TATGTGGACACGACAGGAATG TATGTGGACAAGACAGGAATG TATGTGGACACGACAGGAATG TATGTGGACAAGACAGGAATG |
| GRIN2B | rs2284407 | GGCTTTATCTTTGCTCTCAAAATAG GGCTTTATCTTTTCTCTCAAAATAG TGGCTTTATCTTTGCTCTCAAAATAGC TGGCTTTATCTTTTCTCTCAAAATAGC |
| HTR1B | rs6296 | CCTGTGTATGTGAACCAAGTCAA TTGACTTGGTTCACATACACAGG CCTGTGTATGTCAACCAAGTCAA TTGACTTGGTTGACATACACAGG |
| HTR2A | rs6311 | CTGTGAGTGTCGGGCACTTCCAT ATGGAAGTGCCG GACTCTCACAG CTGTGAGTGCTGGCACTTCCAT ATGGAAGTGCCA GACTCTCACAG |
| HTR2A | rs6313 | GACTTTAACTCCGGAGAAGCTAA TTAGCTTCTCCGGAGTTAAAGTC GACTTTAACTCTGGAGAAGCTAA |

| Gen | Código rs | Secuencia del oligonucléotido |
|--------|-----------|--|
| HTR2A | rs6313 | TTAGCTTCTCCAGAGTTAAAGTC |
| HTR2A | rs6314 | TCTTCAGAATGCTGCTTTCCT TCTTCAGAATACTGCTTTCCT CTTCAGAATGCTGCTTTCCT CTTCAGAATACTGCTTTCCT |
| MAOA | rs6323 | TTAATTCAGCGGCTTCCAATGGG TTAATTCAGCGTCTTCCAATGGG TAATTCAGCGGCTTCCAATGG TAATTCAGCGTCTTCCAATGG |
| NGF | rs6330 | ATCCCCAAGCCCACTGGACT ATCCCCAAGTCCACTGGACT AGTCCAGTGGGCTTGGGGGAT AGTCCAGTGGACTTGGGGGAT |
| PNMT | rs897453 | ACTCTCTAAGCATCACCATCCTG ACTCTCTAAGCGTCACCATCCTG AGGATGGTGATGCTTAGAGAG AGGATGGTGACGCTTAGAGAG |
| PNMT | rs7946 | TCACCTACATAGTGGCTCTCCTA TCACCTACATAATGGCTCTCCTA CACCTACATAGTGGCTCTCCT CACCTACATAATGGCTCTCCT |
| SLC6A2 | rs998424 | AGCCCAGCCCCTACTCACC AGCCCAGCCTCTACTCACC GCCCAGCCCCTACTCAC GCCCAGCCTCTACTCAC |
| SLC6A2 | rs3785157 | TGGGGTCTCGGAGTGCATTAG TTGGGGTCTCAGAGTGCATTAG TGGGGTCTCGGAGTGCATTA TGGGGTCTCAGAGTGCATTA |
| SLC6A2 | rs5569 | TCTGCCAGGCCGTGATGACAGC TCTGCCAGGCCTGTGATGACAGC GCTGTCATCACGGCCTGGCAGA GCTGTCATCACAGGCCTGGCAGA |
| SLC6A4 | rs1042173 | TGAGTAGCATATAGAATTTATTGCTG TGAGTAGCATATATAATTTATTGCTG CAGCAATAAAAATTCTATATGCTACTCA CAGCAATAAAAATTATATGCTACTCA |
| SLC6A4 | rs2228673 | TTCCAGGAGTTGTTGCAGCTGGT TTCCAGGAGTCTTGCAGCTGGT |

| Gen | Código rs | Secuencia del oligonucleótido |
|---------------|------------|--|
| SLC6A4 | rs2228673 | TCCAGGAGTTGTTGCAGCTGG TCCAGGAGTTCTTGCAGCTGG |
| SLC6A4 | rs28914828 | CTGGGTGGTGGTGGTCGCTG CTGGGTGGTCGTGGTCGCTG TGGGTGGTGGTGGTCGCT TGGGTGGTCGTGGTCGCT |
| SLC6A4 | rs6354 | GCTTGCCCTCTATTGCAGAATAA GCTTGCCCTCTCTTGCAGAATAA CTTGCCCTCTATTGCAGAATA CTTGCCCTCTCTTGCAGAATA |
| SNAP25 | rs363006 | GCAGTCAGCAAGTCCCTACTGCG CGCAGTAGGGACTTGCTGACTGC GCAGTCAGCAAATCCCTACTGCG CGCAGTAGGGATTTGCTGACTGC |
| SNAP25 | rs362567 | GTCTCCAATGCACAAAATCCTCA TGAGGATTTTGTGCATTGGAGAC GTCTCCAATGCGCAAAATCCTCA TGAGGATTTTGCGCATTGGAGAC |
| SNAP25 | rs3746544 | AACTCCTTGATGTCTTGAGTT AACTCCTTGAGGCCTGAGTT GAAACTC AAGACATC AAGGAGTTAG GAAACTC AGGACCTCAAGGAGTTAG |
| SNAP25 | rs6077690 | GTAGTCAGAATTTTCCAAAGT GTAGTCAGAATATTTCCAAAGT TAGTCAGAATTTTCCAAAG TAGTCAGAATATTTCCAAAG |
| SNAP25 | rs363020 | TGAGCCTTTGTAGAAAGCACTTT TGAGCCTTTGTTGAAAGCACTTT GAGCCTTTGTAGAAAGCACTT GAGCCTTTGTTGAAAGCACTT |
| SNAP25 | rs3787283 | GGAATCATTGTTTTCTGGAAT GGAATCATTATTTTCTGGAAT GGAATCATTGTTTTCTGGAA GGAATCATTATTTTCTGGAA |
| SYP | rs2293945 | TTCTCTCCCCCGCCTTTCCGCC TTCTCTCCCCCTGCCTTTCCGCC TCTCTCCCCCGCCTTTCCGC TCTCTCCCCCTGCCTTTCCGC |
| SYP | rs17855914 | GCTGAGAGACCTTGTGACCTCGG |

| Gen | Código rs | Secuencia del oligonucléotido |
|-------------|------------|--|
| SYP | rs17855914 | GCTGAGAGACCCTGTGACCTCGG CTGAGAGACCTTGTGACCTCG CTGAGAGACCCTGTGACCTCG |
| SYP | rs5906754 | TGTTTTACGAC AGCCGTCAGAA TTCTGACGGCTGTGCTGAAAACA TGTTTTACGAT AGCCGTCAGAA TTCTGACGGCTATGCTGAAAACA |
| SYP | rs3817678 | AACCTTCCAGAACCCACCCTA TAGGGTGGGGTTCTGAAAGGTT AACCTTCCAGGACCCACCCTA TAGGGTGGGGTCTGAAAGGTT |
| TPH2 | rs1843809 | ACTTTAATTATGCCACTCTTGTT ACTTTAATTATTCCACTCTTGTT ACTTTAATTATGCCACTCTTGTT ACTTTAATTATTCCACTCTTGTT |
| TPH2 | rs1386493 | TAATTTGCACAGGACCATGAGCT TAATTTGCACAAGACCATGAGCT AATTTGCACAGGACCATGAGC AATTTGCACAAGACCATGAGC |
| TPH2 | rs4565946 | GCTTAGCTAAGGCCCGTGACTA GCTTAGCTAAGGCCCGTGACTA CTTAGCTAAGGCCCGTGACT CTTAGCTAAGGCCCGTGACT |
| TPH2 | rs1386497 | TGAAAAAAAAACCCACAGATTC GAATCTGTGGGTTTTTTTCAA TGAAAAAAAAACCCACAGATTC GAATCTGTGGGTTTTTTTCAA |
| TPH2 | rs4570625 | CTTGACATATTCTAATTTGTGC CTTGACATATTATAATTTGTGC TTGACATATTCTAATTTGTG TTGACATATTATAATTTGTG |

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta MT. 2007. Aspectos genéticos y moleculares en el trastorno por déficit de atención con hiperactividad: búsqueda de los genes implicados en el diagnóstico clínico. *Rev. Neurol.* 44 Suppl 2:S37-S41.
- Adams J, Crosbie J, Wigg K, Ickowicz A, Pathare T et al. 2004. Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2A (GRIN2A) gene as a positional candidate for attention-deficit/hyperactivity disorder in the 16p13 region. *Mol. Psychiatry* 9(5):494-9.
- Aitchison JD, Galitski T. 2003. Inventories to insights. *J. Cell Biol.* 161(3):465-9.
- Allen-Brady K, Miller J, Matsunami N, Stevens J, Block H et al. 2009. A high-density SNP genome-wide linkage scan in a large autism extended pedigree. *Mol. Psychiatry* 14(6):590-600.
- Almeida LG, Ricardo-Garcell J, Prado H, Barajas L, Fernandez-Bouzas A et al. 2010. Reduced right frontal cortical thickness in children, adolescents and adults with ADHD and its correlation to clinical variables: A cross-sectional study. *J. Psychiatr. Res.* 44(16):1214-23.
- Althaus M, Groen Y, Wijers AA, Minderaa RB, Kema IP et al. 2010. Variants of the SLC6A3 (DAT1) polymorphism affect performance monitoring-related cortical evoked potentials that are associated with ADHD. *Biol. Psychol.* 85:19-32. 262.
- Amin N, Aulchenko YS, Dekker MC, Ferdinand RF, van SA et al. 2009. Suggestive linkage of ADHD to chromosome 18q22 in a young genetically isolated Dutch population. *Eur. J. Hum. Genet.* 17(7):958-66.
- Anguelova M, Benkelfat C, Turecki G. 2003a. A systematic review of association studies investigating genes coding for serotonin receptors and the serotonin transporter: I. Affective disorders. *Mol. Psychiatry* 8(6):574-91.
- Anguelova M, Benkelfat C, Turecki G. 2003b. A systematic review of association studies investigating genes coding for serotonin receptors and the serotonin transporter: II. Suicidal behavior. *Mol. Psychiatry* 8(7):646-53.
- Arcos-Burgos M, Jain M, Acosta MT, Shively S, Stanescu H et al. 2010. A common variant of the latrophilin 3 gene, LPHN3, confers susceptibility to ADHD and predicts effectiveness of stimulant medication. *Mol. Psychiatry* 15(11):1053-66.
- Armero P, Muriel C, Santos J, Sanchez-Montero FJ, Rodriguez RE, Gonzalez-Sarmiento R. 2005. COMT (Val158Met) polymorphism is not associated to neuropathic pain in a Spanish population. *Eur. J. Pain* 9(3):229-32.
- Amsten, A.F.T. 2004. Molecular pharmacology and the treatment of Tourette's Syndrome and Attention Deficit-Hyperactivity Disorder. *Neuroscience, Molecular Medicine and the Therapeutic Transformation of Neurology*, S.G. Waxman, Ed. Academic Press, pp. 183-192.
- Artigas-Pallarés J. 2002. Fenotipos conductuales. *Rev. Neurol.* 34 Suppl 1:S38-S48.
- Artigas-Pallarés J. 2003. Comorbilidad en el trastorno por déficit de atención con hiperactividad. *Rev Neurol.* 36 Suppl 1:S68-78.
- Baeyens D, Roeyers H, Walle JV. 2006. Subtypes of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): distinct or related disorders across measurement levels?. *Child Psychiatry Hum Dev.* 36(4):403-17.
- Banaschewski T, Becker K, Scherag S, Franke B, Coghill D. 2010. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: an overview. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry* 19(3):237-57.

- Barkley RA. 1998. Attention-deficit hyperactivity disorder. *Sci. Am.* 279(3):66-71.
- Barr CL, Wigg K, Malone M, Schachar R, Tannock R et al. 1999. Linkage study of catechol-O-methyltransferase and attention - deficit hyperactivity disorder. *Am. J. Med. Genet.* 88(6):710-3.
- Barr CL, Feng Y, Wigg K, Bloom S, Roberts W et al. 2000. Identification of DNA variants in the SNAP-25 gene and linkage study of these polymorphisms and attention-deficit hyperactivity disorder. *Mol. Psychiatry* 5(4):405-9.
- Barr CL, Feng Y, Wigg KG, Schachar R, Tannock R et al. 2001a. 5'-untranslated region of the dopamine D4 receptor gene and attention-deficit hyperactivity disorder. *Am. J. Med. Genet.* 105(1):84-90.
- Barr CL, Xu C, Kroft J, Feng Y, Wigg K et al. 2001b. Haplotype study of three polymorphisms at the dopamine transporter locus confirm linkage to attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 49(4):333-9.
- Barr CL, Kroft J, Feng Y, Wigg K, Roberts W et al. 2002. The norepinephrine transporter gene and attention-deficit hyperactivity disorder. *Am. J. Med. Genet.* 114(3):255-9.
- Bauermeister JA, Johns MM, Sandfort TG, Eisenberg A, Grossman et al. 2010. Relationship trajectories and psychological well-being among sexual minority youth. *J Youth Adolesc.* 39(10):1148-63.
- Bellgrove MA, Hawi Z, Lowe N, Kirley A, Robertson IH, Gill M. 2005. DRD4 gene variants and sustained attention in attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): effects of associated alleles at the VNTR and -521 SNP. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 136(1):81-6.
- Benitez J. 2008. Farmacogenética como herramienta en la predicción de la toxicidad y de individualización del tratamiento. *Oncología* 3(1):71-7.
- Benito-Moraga R. 2008. Evolución en el Trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) a lo largo de la vida. ed. Castejón JI. Madrid: Draft Editores S.L.
- Benjamin J, Li L, Patterson C, Greenberg BD, Murphy DL, Hamer DH. 1996. Population and familial association between the D4 dopamine receptor gene and measures of Novelty Seeking. *Nat. Genet.* 12(1):81-4.
- Biederman J, Faraone SV, Keenan K, Benjamin J, Krifcher B et al. 1992. Further evidence for family-genetic risk factors in attention deficit hyperactivity disorder. Patterns of comorbidity in probands and relatives psychiatrically and pediatrically referred samples. *Arch. Gen. Psychiatry* 49(9):728-38.
- Biederman J, Spencer T. 1999. Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) as a noradrenergic disorder. *Biol Psychiatry.* 46(9):1234-42.
- Biederman J, Spencer TJ. 2000. Genetics of childhood disorders: XIX. ADHD, Part 3: Is ADHD a noradrenergic disorder? *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 39(10):1330-3.
- Biederman J. 2005. Attention-deficit/hyperactivity disorder: a selective overview. *Biol. Psychiatry* 57(11):1215-20.
- Biederman J, Kim JW, Doyle AE, Mick E, Fagerness J et al. 2008. Sexually dimorphic effects of four genes (COMT, SLC6A2, MAOA, SLC6A4) in genetic associations of ADHD: a preliminary study. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 147B(8):1511-8.
- Blanc O, Brousse G, Meary A, Leboyer M, Llorca PM. 2010. Pharmacogenetic of response efficacy to antipsychotics in schizophrenia: pharmacodynamic aspects. Review and implications for clinical research. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 24(2):139-60.

- Bobb AJ, Addington AM, Sidransky E, Gornick MC, Lerch JP et al. 2005. Support for association between ADHD and two candidate genes: NET1 and DRD1. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 134(1):67-72.
- Bosch E, Laayouni H, Morcillo-Suarez C, Casals F, Moreno-Estrada A et al. 2009. Decay of linkage disequilibrium within genes across HGDP-CEPH human samples: most population isolates do not show increased LD. *BMC Genomics* 10:338.
- Brookes K, Xu X, Chen W, Zhou K, Neale B et al. 2006a. The analysis of 51 genes in DSM-IV combined type attention deficit hyperactivity disorder: association signals in DRD4, DAT1 and 16 other genes. *Mol. Psychiatry* 11(10):934-53.
- Brookes KJ, Mill J, Guindalini C, Curran S, Xu X et al. 2006b. A common haplotype of the dopamine transporter gene associated with attention-deficit/hyperactivity disorder and interacting with maternal use of alcohol during pregnancy. *Arch. Gen. Psychiatry* 63(1):74-81.
- Brookes KJ, Hawi Z, Kirley A, Barry E, Gill M, Kent L. 2008a. Association of the steroid sulfatase (STS) gene with attention deficit hyperactivity disorder. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 147B(8):1531-5.
- Brookes KJ, Xu X, Anney R, Franke B, Zhou K et al. 2008b. 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):1519-23.
- Brophy K, Hawi Z, Kirley A, Fitzgerald M, Gill M. 2002. Synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25) and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): evidence of linkage and association in the Irish population. *Mol. Psychiatry* 7(8):913-917.
- Brunner D, Hen R. 1997. Insights into the neurobiology of impulsive behavior from serotonin receptor knockout mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 836:81-105.
- Buitelaar JK, Montgomery SA, van Zwieten-Boot BJ. 2003. Attention deficit hyperactivity disorder: guidelines for investigating efficacy of pharmacological intervention. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 13(4):297-304.
- Bukstein O. 2009. Substance use disorders and ADHD. *CNS Spectr.* 14 (Supl 6):10-18.
- Buschgens CJ, van Aken MA, Swinkels SH, Altink ME, Fliers EA, Rommelse NN, Minderaa RB, Sergeant JA, Faraone SV, Buitelaar JK. Differential family and peer environmental factors are related to severity and comorbidity in children with ADHD. *J Neural Transm.* 115(2):177-86.
- Bymaster FP, Katner JS, Nelson DL, Hemrick-Luecke SK, Threlkeld PG et al. 2002. Atomoxetine increases extracellular levels of norepinephrine and dopamine in prefrontal cortex of rat: a potential mechanism for efficacy in attention deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychopharmacology* 27(5):699-711.
- Cardo E, Servera M. 2008. Trastorno por déficit de atención / hiperactividad: estado de la cuestión y futuras líneas de investigación. *Rev. Neurol.* 46(6):365-72.
- Carrasco X, Rothhammer P, Moraga M, Henriquez H, Aboitiz F, et al. 2004. Presencia de los alelos DRD4/7R y DAT1/10R en miembros de familias chilenas con síndrome de déficit atencional con hiperactividad. *Rev. Med. Chil.* 132(9):1047-52.
- Carroll LS, Kendall K, O'Donovan MC, Owen MJ, Williams NM. 2009. Evidence that putative ADHD low risk alleles at SNAP25 may increase the risk of schizophrenia. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 150B(7):893-9.
- Cases O, Lebrand C, Giros B, Vitalis T, De ME et al. 1998. Plasma membrane transporters of serotonin, dopamine, and norepinephrine mediate serotonin accumulation in atypical locations in the developing brain of monoamine oxidase A knock-outs. *J. Neurosci.* 18(17):6914-27.

- Castellanos FX, Tannock R. 2002. Neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorder: the search for endophenotypes. *Nat. Rev. Neurosci.* 3(8):617-28.
- Cerasa A, Cherubini A, Quattrone A, Gioia MC, Tarantino P et al. 2010. Met(158) variant of the catechol-O-methyltransferase genotype is associated with thicker cortex in adult brain. *Neuroscience.* 167:809-814.
- 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.
- Cheon KA, Kim BN, Cho SC. 2007. Association of 4-repeat allele of the dopamine D4 receptor gene exon III polymorphism and response to methylphenidate treatment in Korean ADHD children. *Neuropsychopharmacology* 32(6):1377-83.
- Cheon KA, Jun JY, 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(5):291-8.
- Cheon KA, Cho DY, Koo MS, Song DH, Namkoong K. 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):564-70.
- Ciliax BJ, Drash GW, Staley JK, Haber S, Mobley CJ et al. 1999a. Immunocytochemical localization of the dopamine transporter in human brain. *J. Comp Neurol.* 409(1):38-56.
- Comings DE, Gade R, Muhleman D, Sverd J. 1995. No association of a tyrosine hydroxylase gene tetranucleotide repeat polymorphism in autism, Tourette syndrome, or ADHD. *Biol Psychiatry* 37(7):484-6.
- Comings DE, Gade-Andavolu R, Gonzalez N, Blake H, Wu S, MacMurray JP. 1999. Additive effect of three noradrenergic genes (ADRA2a, ADRA2C, DBH) on attention-deficit hyperactivity disorder and learning disabilities in Tourette syndrome subjects. *Clin. Genet.* 55(3):160-72.
- Comings DE, Gade-Andavolu R, Gonzalez N, Wu S, Muhleman D et al. 2000a. Multivariate analysis of associations of 42 genes in ADHD, ODD and conduct disorder. *Clin. Genet.* 58(1):31-40.
- Comings DE, Gade-Andavolu R, Gonzalez N, Wu S, Muhleman D et al. 2000b. Comparison of the role of dopamine, serotonin, and noradrenaline genes in ADHD, ODD and conduct disorder: multivariate regression analysis of 20 genes. *Clin. Genet.* 57(3):178-96.
- Comings DE, Gonzalez NS, Cheng Li SC, MacMurray J. 2003. A "line item" approach to the identification of genes involved in polygenic behavioral disorders: the adrenergic alpha2A (ADRA2A) gene. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 118B(1):110-4.
- Conner AC, Kissling C, Hodges E, Hunnerkopf R, Clement RM et al. 2008. Neurotrophic factor-related gene polymorphisms and adult attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) score in a high-risk male population. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 147B(8):1476-80.
- Contini V, Victor MM, Marques FZ, Bertuzzi GP, Salgado CA 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):269-76.

- Cook EH, Jr., Stein MA, Ellison T, Unis AS, Leventhal BL. 1995. Attention deficit hyperactivity disorder and whole-blood serotonin levels: effects of comorbidity. *Psychiatry Res.* 57(1):13-20.
- Cortés A, Paré L., Sedano L., Baiget M. 2007. Utilidad del Amplichip CYP450 para el genotipado del citocromo CYP2D6. *Química Clínica* 26(5):231-6.
- Crosbie J, Perusse D, Barr CL, Schachar RJ. 2008. Validating psychiatric endophenotypes: inhibitory control and attention deficit hyperactivity disorder. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32(1):40-55.
- Cumyn L, French L, Hechtman L. 2009. Comorbidity in adults with attention-deficit hyperactivity disorder. *Can. J. Psychiatry* 54(10):673-83.
- Curran S, Purcell S, Craig I, Asherson P, Sham P. 2005. The serotonin transporter gene as a QTL for ADHD. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsych. Genet.* 134(1):42-7.
- Curtis LT, Patel K. Nutritional and environmental approaches to preventing and treating autism and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): a review. *J Altern Complement Med.* 14(1):79-85.
- Cuyas E, Olano-Martin E, Khymenets O, Hernandez L, Jofre-Monseny L et al. 2010. Errors and reproducibility of DNA array-based detection of allelic variants in ADME genes: PHARMAchip. *Pharmacogenomics.* 11(2):257-66.
- da Silva TL, Pianca TG, Roman T, Hutz MH, Faraone SV et al. 2008. Adrenergic alpha2A receptor gene and response to methylphenidate in attention-deficit/hyperactivity disorder-predominantly inattentive type. *J. Neural Transm.* 115(2):341-5.
- Dafny N, Yang PB. 2006. The role of age, genotype, sex, and route of acute and chronic administration of methylphenidate: a review of its locomotor effects. *Brain Res. Bull.* 68(6):393-405.
- Daly G, Hawi Z, Fitzgerald M, Gill M. 1999. Mapping susceptibility loci in attention deficit hyperactivity disorder: preferential transmission of parental alleles at DAT1, DBH and DRD5 to affected children. *Mol. Psychiatry* 4(2):192-6.
- Das M, Bhowmik AD, Sinha S, Chattopadhyay A, Chaudhuri K et al. 2006. MAOA promoter polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in indian children. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 141(6):637-42.
- Dasbanerjee T, Middleton FA, Berger DF, Lombardo JP, Sagvolden T, Faraone SV. 2008. A comparison of molecular alterations in environmental and genetic rat models of ADHD: a pilot study. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 147B(8):1554-63.
- Dauden TE. 2006. Farmacogenética I. Concepto, historia, objetivos y áreas de estudio. *Actas Dermosifiliogr.* 97(10):623-9.
- Davies W, Humby T, Isles AR, Burgoyne PS, Wilkinson LS. 2007. X-monosomy effects on visuospatial attention in mice: a candidate gene and implications for Turner syndrome and attention deficit hyperactivity disorder. *Biol. Psychiatry* 61(12):1351-60.
- Davies W, Humby T, Kong W, Otter T, Burgoyne PS, Wilkinson LS. 2009. Converging pharmacological and genetic evidence indicates a role for steroid sulfatase in attention. *Biol. Psychiatry* 66(4):360-7.
- De Jager PL, Chibnik LB, Cui J, Reischl J, Lehr S et al. 2009. Integration of genetic risk factors into a clinical algorithm for multiple sclerosis susceptibility: a weighted genetic risk score. *Lancet Neurol.* 8(12):1111-9.
- De L, V, Muglia P, Vincent JB, Lanktree M, Jain U, Kennedy JL. 2004. Adrenergic alpha 2C receptor genomic organization: association study in adult ADHD. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 127B(1):65-7.

- DeYoung CG, Peterson JB, Seguin JR, Mejia JM, Pihl RO et al. 2006. The dopamine D4 receptor gene and moderation of the association between externalizing behavior and IQ. *Arch. Gen. Psychiatry* 63(12):1410-6.
- DeYoung CG, Getchell M, Kuposov RA, Yrigollen CM, Haeffel GJ et al. 2010. Variation in the catechol-O-methyltransferase Val 158 Met polymorphism associated with conduct disorder and ADHD symptoms, among adolescent male delinquents. *Psychiatr. Genet.* 20(1):20-4.
- Díaz Atienza J. 2006. Comorbilidad en el TDAH. *Rev. Psiq. y Psicol. del niño y del adolesc.* 6(1):44-55
- Ding YC, Chi HC, Grady DL, Morishima A, Kidd JR et al. 2002. Evidence of positive selection acting at the human dopamine receptor D4 gene locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99(1):309-14.
- Doherty MJ, Glass IA, Bennett CL, Cotter PD, Watson NF et al. 2003. An Xp; Yq translocation causing a novel contiguous gene syndrome in brothers with generalized epilepsy, ichthyosis, and attention deficits. *Epilepsia* 44(12):1529-35.
- Domschke K, Sheehan K, Lowe N, Kirley A, Mullins C et al. 2005. Association analysis of the monoamine oxidase A and B genes with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in an Irish sample: preferential transmission of the MAO-A 941G allele to affected children. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 134B(1):110-4.
- Dopheide JA, Pliszka SR. 2009. Attention-deficit-hyperactivity disorder: an update. *Pharmacotherapy* 29(6):656-79.
- Dorval KM, Wigg KG, Crosbie J, Tannock R, Kennedy JL et al. 2007. Association of the glutamate receptor subunit gene GRIN2B with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Genes Brain Behav.* 6(5): 444-52.
- Draghici S, Kuklin A, Hoff B, Shams S. 2001. Experimental design, analysis of variance and slide quality assessment in gene expression arrays. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 4(3):332-7.
- DuPaul GJ, Anastopoulos AD, Power TJ, Reid R, Ikeda MJ, McGoey KE. 1998a. Parent Ratings of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Symptoms: Factor Structure and Normative Data. *J. of Psychopath. and Behav. Assess.* 20(1):83-102
- DuPaul G.J., Power T.J., Reid R, Anastopoulos A. D.. 1998b. ADHD Rating Scale--IV: Checklists, Norms, and Clinical Interpretation, The Guilford Press. New York.
- Durston S, de Zeeuw P, Staal WG. 2009. Imaging genetics in ADHD: A focus on cognitive control. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 33: (5) 674-689.
- Durston S. 2010. Imaging genetics in ADHD. *Neuroimage.* 53(3):832-8.
- Ebstein RP, Novick O, Umansky R, Priel B, Osher Y et al. 1996. Dopamine D4 receptor (D4DR) exon III polymorphism associated with the human personality trait of Novelty Seeking. *Nat. Genet.* 12(1):78-80.
- Eisenberg J, Mei-Tal G, Steinberg A, Tartakovsky E, Zohar A et al. 1999. Haplotype relative risk study of catechol-O-methyltransferase (COMT) and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): association of the high-enzyme activity Val allele with ADHD impulsive-hyperactive phenotype. *Am. J. Med. Genet.* 88(5):497-502.
- Elia J, Devoto M. 2007. ADHD genetics: 2007 update. *Curr. Psychiatry Rep.* 9(5):434-9.
- Elia J, Capasso M, Zaheer Z, Lantieri F, Ambrosini P et al. 2009a. Candidate gene analysis in an on-going genome-wide association study of attention-deficit hyperactivity disorder: suggestive association signals in ADRA1A. *Psychiatr. Genet.* 19(3):134-41.

- Elia J, Gai X, Xie HM, Perin JC, Geiger E et al. 2009b. Rare structural variants found in attention-deficit hyperactivity disorder are preferentially associated with neurodevelopmental genes. *Mol. Psychiatry*. 15(6): 637–646.
- Elia J, Arcos-Burgos M, Bolton KL, Ambrosini PJ, Berrettini W, Muenke M. 2009c. ADHD latent class clusters: DSM-IV subtypes and comorbidity. *Psychiatry Res*. 170(2-3):192-8.
- Evans WE, Relling MV. 1999. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 286(5439):487-91.
- Faraone SV, Biederman J. 1998. Neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder. *Biol. Psychiatry* 44(10):951-8.
- Faraone SV, Biederman J, Weiffenbach B, Keith T, Chu MP et al. 1999. Dopamine D4 gene 7-repeat allele and attention deficit hyperactivity disorder. *Am. J. Psychiatry* 156(5):768-70.
- Faraone SV, Doyle AE. 2000. Genetic influences on attention deficit hyperactivity disorder. *Curr. Psychiatry Rep.* 2(2):143-6.
- Faraone SV, Doyle AE, Mick E, Biederman J. 2001. Meta-analysis of the association between the 7-repeat allele of the dopamine D(4) receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Am. J. Psychiatry* 158(7):1052-7.
- Faraone SV, Spencer T, Aleardi M. 2004. Etiology and pathophysiology of adult attention deficit hyperactivity disorder. *Primary Psychiatry* 11:28-40.
- Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE. 2005. Molecular genetics of attention deficit/hyperactivity disorder. *Biol.* 57:1313-23.
- Feng J, Sobell JL, Heston LL, Goldman D, Cook E Jr et al. 1998. Variants in the alpha2A AR adrenergic receptor gene in psychiatric patients. *Am. J. Med. Genet.* 81(5):405-10.
- Feng Y, Crosbie J, Wigg K, Pathare T, Ickowicz A et al. 2005a. The SNAP25 gene as a susceptibility gene contributing to attention-deficit hyperactivity disorder. *Mol. Psychiatry* 10(11):998-1005, 973.
- Feng Y, Wigg KG, Makkar R, Ickowicz A, Pathare T et al. 2005b. Sequence variation in the 3'-untranslated region of the dopamine transporter gene and attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 139B(1):1-6.
- Fernandez A, Quintero J, Hornero R, Zuluaga P, Navas M et al. 2009. Complexity analysis of spontaneous brain activity in attention-deficit/hyperactivity disorder: diagnostic implications. *Biol Psychiatry* 65(7):571-7.
- Ferreira AA, Neves FS, da Rocha FF, Silva GS, Romano-Silva MA et al. 2009. The role of 5-HTTLPR polymorphism in antidepressant-associated mania in bipolar disorder. *J. Affect. Disord.* 112(1-3):267-72.
- Flint J, Yule W. 1994. Behavioural phenotypes. *Child and Adolescent Psychiatry: Modern Approaches*, 3rd ed (eds M. Rutter, E. Taylor L. Hersov), pp. 666-87. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Fone KC, Nutt DJ. 2005. Stimulants: use and abuse in the treatment of attention deficit hyperactivity disorder. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5(1):87-93.
- Forero DA, Arboleda GH, Vasquez R, Arboleda H. 2009. Candidate genes involved in neural plasticity and the risk for attention-deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis of 8 common variants. *J. Psychiatry Neurosci.* 34(5):361-6.
- Franke B, Neale BM, Faraone SV. 2009. Genome-wide association studies in ADHD. *Hum. Genet.* 126(1):13-50.
- Friedel S, Saar K, Sauer S, Dempfle A, Walitza S et al. 2007. Association and linkage of allelic variants of the dopamine transporter gene in ADHD. *Mol. Psychiatry* 12(10):923-33.

- Froehlich TE, McGough JJ, Stein MA. 2010. Progress and promise of attention-deficit hyperactivity disorder pharmacogenetics. *CNS. Drugs* 24(2):99-117.
- Fung YK, Lau YS. 1989. Effect of nicotine pretreatment on striatal dopaminergic system in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 32(1):221-6.
- Gadow KD, Roohi J, DeVincent CJ, Kirsch S, Hatchwell E. 2009. Association of COMT (Val158Met) and BDNF (Val66Met) gene polymorphisms with anxiety, ADHD and tics in children with autism spectrum disorder. *J. Autism Dev. Disord.* 39(11):1542-51.
- Gainetdinov RR, Jones SR, Caron MG. 1999. Functional hyperdopaminergia in dopamine transporter knock-out mice. *Biol. Psychiatry* 46(3):303-11.
- Gau SS, Shang CY. 2010. Executive functions as endophenotypes in ADHD: evidence from the Cambridge Neuropsychological Test Battery (CANTAB). *J. Child Psychol. Psychiatry* 51(7):838-49.
- Gilbert DL, Wang Z, Sallee FR, Ridell KR, Merhar S et al. 2006. Dopamine transporter genotype influences the physiological response to medication in ADHD. *Brain* 129(Pt 8):2038-46.
- Gizer IR, Ficks C, Waldman ID. 2009. Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum. Genet.* 126(1):51-90.
- Goos LM, Crosbie J, Payne S, Schachar R. 2009. Validation and extension of the endophenotype model in ADHD patterns of inheritance in a family study of inhibitory control. *Am. J. Psychiatry* 166(6):711-7.
- Grady S, Marks MJ, Wonnacott S, Collins AC. 1992. Characterization of nicotinic receptor-mediated [3H]dopamine release from synaptosomes prepared from mouse striatum. *J. Neurochem.* 59(3):848-56.
- Grady DL, Harxhi A, Smith M, Flodman P, Spence MA et al. 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.* 136(1):33-5.
- Grizenko N, Paci M, Joobor R. 2010. Is the inattentive subtype of ADHD different from the combined/hyperactive subtype? *J. Atten. Disord.* 13(6):649-57.
- Gruber R, Grizenko N, Schwartz G, Ben AL, Gauthier J et al. 2006. Sleep and COMT polymorphism in ADHD children: preliminary actigraphic data. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 45(8):982-9.
- Guan L, Wang B, Chen Y, Yang L, Li J et al. 2008. A high-density single-nucleotide polymorphism screen of 23 candidate genes in attention deficit hyperactivity disorder: suggesting multiple susceptibility genes among Chinese Han population. *Mol. Psychiatry.* 14, 546-554.
- Guo Z, Guilfoyle RA, Thiel AJ, Wang R, Smith LM. 1994. Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports. *Nucleic Acids Res.* 22 (24):5456-65.
- Hahn MK, Steele A, Couch RS, Stein MA, Krueger JJ. 2009. Novel and functional norepinephrine transporter protein variants identified in attention-deficit hyperactivity disorder. *Neuropharmacology* 57(7-8):694-701.
- Halperin JM, Newcorn JH, Koda VH, Pick L, McKay KE, Knott P. 1997. Noradrenergic mechanisms in ADHD children with and without reading disabilities: a replication and extension. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 36(12):1688-97.

- Hamerman S, Fossella J, Ulger C, Brimacombe M, Dermody J. 2004. Dopamine receptor 4 (DRD4) 7-repeat allele predicts methylphenidate dose response in children with attention deficit hyperactivity disorder: a pharmacogenetic study. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* 14(4):564-74.
- Hammerness P, McCarthy K, Mancuso E, Gendron C, Geller D. 2009. Atomoxetine for the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents: a review. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 5:215-26.
- Hawi Z, Foley D, Kirley A, McCarron M, Fitzgerald M, Gill M. 2001. Dopa decarboxylase gene polymorphisms and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): no evidence for association in the Irish population. *Mol. Psychiatry* 6(4):420-4.
- Hawi Z, Dring M, Kirley A, Foley D, Kent L et al. 2002. Serotonergic system and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): a potential susceptibility locus at the 5-HT(1B) receptor gene in 273 nuclear families from a multi-centre sample. *Mol. Psychiatry* 7(7):718-25.
- Hawi Z, Lowe N, Kirley A, Gruenhage F, Nothen M et al. 2003. Linkage disequilibrium mapping at DAT1, DRD5 and DBH narrows the search for ADHD susceptibility alleles at these loci. *Mol. Psychiatry* 8(3):299-308.
- Hawi Z, Segurado R, Conroy J, Sheehan K, Lowe N et al. 2005. Preferential transmission of paternal alleles at risk genes in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 77(6):958-65.
- He M, Allen A. 2010. Testing gene-treatment interactions in pharmacogenetic studies. *J. Biopharm. Stat.* 20(2):301-14.
- Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. 1997. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques* 23(3):504-11.
- Herreros O, Sánchez F, Ajoy M, Gracia R. 2002. Evaluación de niños y adolescentes con trastorno por déficit de atención con hiperactividad / trastornos hiperkinéticos (TDAH). *Rev Psiquiatr Infanto-Juv* 19 (4), 199-214.
- Hess EJ, Jinnah HA, Kozak CA, Wilson MC. 1992. Spontaneous locomotor hyperactivity in a mouse mutant with a deletion including the Snap gene on chromosome 2. *J. Neurosci.* 12(7):2865-74.
- Hemelstein J, Newcorn JH, Halperin JM. 2000. The neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder. *Front Biosci.* 5:D461-D478.
- Hong J, Shu-Leong H, Tao X, Lap-Ping Y. 1998. Distribution of catechol-O-methyltransferase expression in human central nervous system. *Neuroreport* 9(12):2861-4.
- Horner WE, Johnson DE, Schmidt AW, Rollema H. 2007. Methylphenidate and atomoxetine increase histamine release in rat prefrontal cortex. *Eur. J. Pharmacol.* 558(1-3):96-7.
- Hunt PW, Carrington M. 2008. Host genetic determinants of HIV pathogenesis: an immunologic perspective. *Curr. Opin. HIV. AIDS* 3(3):342-8.
- Ickowicz A, Feng Y, Wigg K, Quist J, Pathare T et al. 2007. The serotonin receptor HTR1B: gene polymorphisms in attention deficit hyperactivity disorder. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 144(1):121-5.
- Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. 2007. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeconomic and clinical aspects. *Pharmacol. Ther.* 116(3):496-526.
- Iniesta R, Guino E, Moreno V. 2005. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac. Sanit.* 19(4):333-41.

- Jensen PS, Hinshaw SP, Swanson JM, Greenhill LL, Conners CK et al. 2001. Findings from the NIMH Multimodal Treatment Study of ADHD (MTA): implications and applications for primary care providers. *J. Dev. Behav. Pediatr.* 22(1):60-73.
- Jiang S, Xin R, Wu X, Lin S, Qian Y et al. 2000. Association between attention deficit hyperactivity disorder and the DXS7 locus. *Am. J. Med. Genet.* 96(3):289-92.
- Jiang S, Xin R, Lin S, Qian Y, Tang G et al. 2001. Linkage studies between attention-deficit hyperactivity disorder and the monoamine oxidase genes. *Am. J. Med. Genet.* 105(8):783-8.
- Jiang SD, He M, Qian YP, Wang DX, Zhang Y et al. 2006. [Genome-wide search for linkage to attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) on the X chromosome]. *Yi. Chuan* 28(1):26-30.
- Johansson S, Halmoy A, Mavroconstanti T, Jacobsen KK, Landaas ET et al. 2010. Common variants in the TPH1 and TPH2 regions are not associated with persistent ADHD in a combined sample of 1,636 adult cases and 1,923 controls from four European populations. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 153B(5):1008-15.
- Joung Y, Kim CH, Moon J, Jang WS, Yang J et al. 2010. Association studies of -3081(A/T) polymorphism of norepinephrine transporter gene with attention deficit/hyperactivity disorder in Korean population. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 153B(2):691-4.
- Kelsey DK, Sumner CR, Casat CD, Coury DL, Quintana H, et al. 2004. Once-daily atomoxetine treatment for children with attention-deficit/hyperactivity disorder, including an assessment of evening and morning behavior: a double-blind, placebo-controlled trial. *Pediatrics.* 114(1):e1-8.
- Kent L, Middle F, Hawi Z, Fitzgerald M, Gill M et al. 2001. Nicotinic acetylcholine receptor alpha4 subunit gene polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr. Genet.* 11(1):37-40.
- Kent L, Doerry U, Hardy E, Parmar R, Gingell K et al. 2002. Evidence that variation at the serotonin transporter gene influences susceptibility to attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): analysis and pooled analysis. *Mol. Psychiatry* 7(8):908-12.
- Kent L, Green E, Hawi Z, Kirley A, Dudbridge F et al. 2005. Association of the paternally transmitted copy of common Valine allele of the Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene with susceptibility to ADHD. *Mol. Psychiatry* 10(10):939-43.
- Kent L, Emerton J, Bhadravathi V, Weisblatt E, Pasco G et al. 2008. X-linked ichthyosis (steroid sulfatase deficiency) is associated with increased risk of attention deficit hyperactivity disorder, autism and social communication deficits. *J. Med. Genet.* 45(8):519-24.
- Kereszturi E, Kiraly O, Barta C, Molnar N, Sasvari-Szekely M, Csapo Z. 2006. No direct effect of the -521 C/T polymorphism in the human dopamine D4 receptor gene promoter on transcriptional activity. *BMC. Mol. Biol.* 7:18.
- Kereszturi E, Kiraly O, Csapo Z, Tarnok Z, Gadoros J et al. 2007. [Analysis of the dopamine D4 receptor gene variants in attention deficit hyperactivity disorder]. *Neuropsychopharmacol. Hung.* 9(1):11-8.
- Kereszturi E, Tarnok Z, Bogнар E, Lakatos K, Farkas L et al. 2008. Catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism is associated with methylphenidate response in ADHD children. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 147B(8):1431-5.

- Kieling C, Genro JP, Hutz MH, Rohde LA. 2010. A current update on ADHD pharmacogenomics. *Pharmacogenomics*. 11(3):407-19.
- Kim JG, Armstrong RC, Agoston D, Robinsky A, Wiese C et al. 1997. Myelin transcription factor 1 (Myt1) of the oligodendrocyte lineage, along with a closely related CCHC zinc finger, is expressed in developing neurons in the mammalian central nervous system. *J. Neurosci. Res*. 50(2):272-90.
- Kim YS, Leventhal BL, Kim SJ, Kim BN, Cheon KA et al. 2005. Family-based association study of DAT1 and DRD4 polymorphism in Korean children with ADHD. *Neurosci. Lett*. 390(3):176-81.
- Kim CH, Hahn MK, Joung Y, Anderson SL, Steele AH et al. 2006. A polymorphism in the norepinephrine transporter gene alters promoter activity and is associated with attention-deficit hyperactivity disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103(50):19164-9.
- Kim JW, Biederman J, Arbeitman L, Fagerness J, Doyle AE et al. 2007. Investigation of variation in SNAP-25 and ADHD and relationship to co-morbid major depressive disorder. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet*. 144B(6):781-90.
- Kim KK, Won HH, Cho SS, Park JH, Kim MJ et al. 2009a. Comparison of identical single nucleotide polymorphisms genotyped by the GeneChip Targeted Genotyping 25K, Affymetrix 500K and Illumina 550K platforms. *Genomics* 94(2):89-93.
- Kim JW, Biederman J, Arbeitman L, Fagerness J, Doyle AE et al. 2009b. Investigation of variation in SNAP-25 and ADHD and relationship to co-morbid major depressive disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 144B(6):781-90.
- Kirchheiner J, Seeringer A, Viviani R. 2010. Pharmacogenetics in psychiatry - a useful clinical tool or wishful thinking for the future? *Curr. Pharm. Des*. 16(2):136-44.
- Kirley A, Hawi Z, Daly G, McCarron M, Mullins C et al. 2002. Dopaminergic system genes in ADHD: toward a biological hypothesis. *Neuropsychopharmacology* 27(4):607-19.
- Kirley A, Lowe N, Hawi Z, Mullins C, Daly G et al. 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.
- Kirley A, Lowe N, Mullins C, McCarron M, Daly G et al. 2004. Phenotype studies of the DRD4 gene polymorphisms in ADHD: association with oppositional defiant disorder and positive family history. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet*. 131(1):38-42.
- Kissling C, Retz W, Wiemann S, Coogan AN, Clement RM et al. 2007. A polymorphism at the 3'-untranslated region of the CLOCK gene is associated with adult attention-deficit hyperactivity disorder. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet*. 147B(3):333-8.
- Klug, Cummings, Spencer, Palladino. 2008. Concepts of Genetics. Benjamin Cummings. Pearson Education. San Francisco.
- Kollins SH. 2009. Genética, neurobiología y neurofarmacología del trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH). *RET, Revista de Toxicomanías* 55:19-28.
- Kooij JS, Boonstra AM, Vermeulen SH, Heister AG, Burger H et al. 2007. Response to methylphenidate in adults with ADHD is associated with a polymorphism in SLC6A3 (DAT1). *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet*. 64:585-90.
- Kotler M, Manor I, Sever Y, Eisenberg J, Cohen H et al. 2000. Failure to replicate an excess of the long dopamine D4 exon III repeat polymorphism in ADHD in a family-based study. *Am. J. Med. Genet*. 96(3):278-81.

- Kustanovich V, Merriman B, McGough J, McCracken JT, Smalley SL, Nelson SF. 2003. Biased paternal transmission of SNAP-25 risk alleles in attention-deficit hyperactivity disorder. *Mol. Psychiatry* 8(3):309-15.
- Kustanovich V, Ishii J, Crawford L, Yang M, McGough JJ et al. 2004. Transmission disequilibrium testing of dopamine-related candidate gene polymorphisms in ADHD: confirmation of association of ADHD with DRD4 and DRD5. *Mol. Psychiatry* 9(7):711-717.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409(6822):860-921
- Langley K, Payton A, Hamshere ML, Pay HM, Lawson DC et al. 2003. No evidence of association of two 5HT transporter gene polymorphisms and attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr. Genet.* 13(2):107-110.
- Langley K, Turic D, Peirce TR, Mills S, Van Den Bree MB et al. 2005. No support for association between the dopamine transporter (DAT1) gene and ADHD. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 139(1):7-10.
- Lares-Asseff I., Trujillo-Jiménez F. 2001. La farmacogenética y su importancia en la clínica. *Gac. Méd. Mé.x* 137(3):227-36.
- Lasky-Su J, Anney RJ, Neale BM, Franke B, Zhou K et al. 2008a. Genome-wide association scan of the time to onset of attention deficit hyperactivity disorder. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 147B(8):1355-8.
- Lasky-Su J, Neale BM, Franke B, Anney RJ, Zhou K et al. 2008b. Genome-wide association scan of quantitative traits for attention deficit hyperactivity disorder identifies novel associations and confirms candidate gene associations. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 147B(8):1345-54.
- Laucht M, Skowronek MH, Becker K, Schmidt MH, Esser G et al. 2007. Interacting effects of the dopamine transporter gene and psychosocial adversity on attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms among 15-year-olds from a high-risk community sample. *Arch. Gen. Psychiatry* 64(5):585-90.
- Lawson DC, Turic D, Langley K, Pay HM, Govan CF et al. 2003. Association analysis of monoamine oxidase A and attention deficit hyperactivity disorder. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 116(1):84-9.
- Leddy JJ, Waxmonsky JG, Salis RJ, Paluch RA, Gnagy EM et al. 2009. Dopamine-related genotypes and the dose-response effect of methylphenidate on eating in attention-deficit/hyperactivity disorder youths. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* 19(2):127-36.
- Lesch KP, Timmesfeld N, Renner TJ, Halperin R, Roser C et al. 2008. Molecular genetics of adult ADHD: converging evidence from genome-wide association and extended pedigree linkage studies. *J. Neural Transm.* 115(11):1573-85.
- Lesko LJ. 2007. Personalized medicine: elusive dream or imminent reality? *Clin. Pharmacol. Ther.* 81(6):807-16.
- Levey AI, Hersch SM, Rye DB, Sunahara RK, Niznik HB et al. 1993. Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90(19):8861-5.
- Levin ED, Bradley A, Addy N, Sigurani N. 2002. Hippocampal alpha 7 and alpha 4 beta 2 nicotinic receptors and working memory. *Neuroscience* 109(4):757-65.
- Levin FR. 2007. Diagnosing attention-deficit/hyperactivity disorder in patients with substance use disorders. *J. Clin. Psychiatry* 68 Suppl 11:9-14.

- Levitan RD, Masellis M, Basile VS, Lam RW, Jain U et al. 2002. Polymorphism of the serotonin-2A receptor gene (HTR2A) associated with childhood attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in adult women with seasonal affective disorder. *J. Affect. Disord.* 71(1-3):229-33.
- Lewy F. 1991. The dopamine theory of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Aust. N. Z. J. Psychiatry* 25(2):277-83.
- Lewis CM, Levinson DF, Wise LH, DeLisi LE, Straub RE et al. 2003. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet.* 73(1):34-48.
- Li J, Kang C, Wang Y, Zhou R, Wang B et al. 2006. Contribution of 5-HT2A receptor gene -1438A>G polymorphism to outcome of attention-deficit/hyperactivity disorder in adolescents. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 141(5):473-6.
- Li J, Wang Y, Hu S, Zhou R, Yu X et al. 2007. The monoamine oxidase B gene exhibits significant association to ADHD. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 147B(3):370-4.
- Liu LL, Yang J, Lei GF, Wang GJ, Wang YW, Sun RP. 2008. Atomoxetine increases histamine release and improves learning deficits in an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder: the spontaneously hypertensive rat. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 102(6):527-32.
- Lohoff FW, Ferraro TN. 2010. Pharmacogenetic considerations in the treatment of psychiatric disorders. *Expert. Opin. Pharmacother.* 11(3):423-39.
- Loo SK, Fisher SE, Francks C, Ogdie MN, MacPhie IL et al. 2004. Genome-wide scan of reading ability in affected sibling pairs with attention-deficit/hyperactivity disorder: unique and shared genetic effects. *Mol. Psychiatry* 9(5):485-93.
- Lowe N, Kirley A, Hawi Z, Sham P, Wickham H et al. 2004a. Joint analysis of the DRD5 marker concludes association with attention-deficit/hyperactivity disorder confined to the predominantly inattentive and combined subtypes. *Am. J. Hum. Genet.* 74(2):348-56.
- Lowe N, Kirley A, Mullins C, Fitzgerald M, Gill M, Hawi Z. 2004b. Multiple marker analysis at the promoter region of the DRD4 gene and ADHD: evidence of linkage and association with the SNP -616. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 131(1):33-7.
- Luca P, Laurin N, Misener VL, Wigg KG, Anderson B et al. 2007. Association of the dopamine receptor D1 gene, DRD1, with inattention symptoms in families selected for reading problems. *Mol. Psychiatry* 12(8):776-85.
- Lucarini N, Verrotti A, Napolioni V, Bosco G, Curatolo P. 2007. Genetic polymorphisms and idiopathic generalized epilepsies. *Pediatr Neurol.* 37(3):157-64.
- Maher BS, Marazita ML, Ferrell RE, Vanyukov MM. 2002. Dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis. *Psychiatr. Genet.* 12(4):207-15.
- Manor I, Eisenberg J, Tyano S, Sever Y, Cohen H et al. 2001. Family-based association study of the serotonin transporter promoter region polymorphism (5-HTTLPR) in attention deficit hyperactivity disorder. *Am. J. Med. Genet.* 105(1):91-5.
- Manuck SB, Flory JD, Ferrell RE, Dent KM, Mann JJ, Muldoon MF. 1999. Aggression and anger-related traits associated with a polymorphism of the tryptophan hydroxylase gene. *Biol Psychiatry* 45(5):603-14.
- Markowitz JS, DeVane CL, Pestreich LK, Patrick KS, Muniz R. 2006. A comprehensive in vitro screening of d-, l-, and dl-threo-methylphenidate: an exploratory study. *J Child Adolesc Psychopharmacol.* 16(6):687-98.

- McCracken JT, Smalley SL, McGough JJ, Crawford L, Del'Homme M et al. 2000. Evidence for linkage of a tandem duplication polymorphism upstream of the dopamine D4 receptor gene (DRD4) with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Mol. Psychiatry* 5(5):531-6.
- McEvoy B, Hawi Z, Fitzgerald M, Gill M. 2002. No evidence of linkage or association between the norepinephrine transporter (NET) gene polymorphisms and ADHD in the Irish population. *Am. J. Med. Genet.* 114(6):665-6.
- McGough J, McCracken J, Swanson J, Riddle M, Kollins S et al. 2006. Pharmacogenetics of methylphenidate response in preschoolers with ADHD. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 45(11):1314-22.
- McGough JJ, McCracken JT, Loo SK, Manganiello M, Leung MC et al. 2009. A Candidate Gene Analysis of Methylphenidate Response in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry.* 46:1594-604.
- Meijer WM, Faber A, van den BE, Tobi H. 2009. Current issues around the pharmacotherapy of ADHD in children and adults. *Pharm. World Sci.* 31(5):509-16.
- 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):890-4.
- Mick E, Wozniak J, Wilens TE, Biederman J, Faraone SV. 2009. Family-based association study of the BDNF, COMT and serotonin transporter genes and DSM-IV bipolar-I disorder in children. *BMC. Psychiatry* 9:2.
- Mill J, Curran S, Kent L, Gould A, Hockett L et al. 2002a. Association study of a SNAP-25 microsatellite and attention deficit hyperactivity disorder. *Am. J. Med. Genet.* 114(3):269-71.
- Mill JS, Caspi A, McClay J, Sugden K, Purcell S et al. 2002b. The dopamine D4 receptor and the hyperactivity phenotype: a developmental-epidemiological study. *Mol. Psychiatry* 7(4):383-91.
- Mill J, Curran S, Richards S, Taylor E, Asherson P. 2004a. Polymorphisms in the dopamine D5 receptor (DRD5) gene and ADHD. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 125(1):38-42.
- Mill J, Richards S, Knight J, Curran S, Taylor E, Asherson P. 2004b. Haplotype analysis of SNAP-25 suggests a role in the aetiology of ADHD. *Mol. Psychiatry* 9(8):801-10.
- Mill J, Xu X, Ronald A, Curran S, Price T et al. 2005. Quantitative trait locus analysis of candidate gene alleles associated with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in five genes: DRD4, DAT1, DRD5, SNAP-25, and 5HT1B. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 133(1):68-73.
- Mill J, Petronis A. 2008. Pre- and peri-natal environmental risks for attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD): the potential role of epigenetic processes in mediating susceptibility. *J Child Psychol Psychiatry.* Oct;49(10):1020-30.
- Misener VL, Luca P, Azeke O, Crosbie J, Waldman I et al. 2004. Linkage of the dopamine receptor D1 gene to attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol. Psychiatry* 9(5):500-9.
- Molano-Bilbao A, Olano-Martín E, Tejedor D, Ferrer-Alcón M. 2009. Genética del Trastorno por déficit de atención e hiperactividad. In Trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) a lo largo de la vida, ed. F.J.Quintero Gutiérrez del Álamo, J.Correas-Laufer, F.J.Quintero Lumbreas, 4:27-52. Barcelona: Elsevier Masson España S.L.
- Montañés-Rada F, Gangoso-Fermoso AB, Martínez-Granero MA. 2009. Fármacos para el trastorno por déficit de atención/hiperactividad. *Rev. Neurol.* 48(9):469-81.

- Motulsky AG. 1957. Drug reactions enzymes, and biochemical genetics. *J. Am. Med. Assoc.* 165(7):835-7.
- Muglia P, Jain U, Inkster B, Kennedy JL. 2002. A quantitative trait locus analysis of the dopamine transporter gene in adults with ADHD. *Neuropsychopharmacology* 27(4):655-62.
- Muller DJ, Klempan TA, De L, V, Sicard T, Volavka J et al. 2005. The SNAP-25 gene may be associated with clinical response and weight gain in antipsychotic treatment of schizophrenia. *Neurosci. Lett.* 379(2):81-9.
- Myakishev MV, Khripin Y, Hu S, Hamer DH. 2001. High-throughput SNP genotyping by allele-specific PCR with universal energy-transfer-labeled primers. *Genome Res.* 11(1):163-9.
- Neale BM, Faraone SV. 2008a. Perspective on the genetics of attention deficit/hyperactivity disorder. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 147B(8):1334-6.
- Neale BM, Lasky-Su J, Anney R, Franke B, Zhou K et al. 2008b. Genome-wide association scan of attention deficit hyperactivity disorder. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 147B(8):1337-44.
- Nemoda Z, Angyal N, Tarnok Z, Gadoros J, Sasvari-Szekely M. 2009. Carboxylesterase 1 gene polymorphism and methylphenidate response in ADHD. *Neuropharmacology* 57(7-8):731-3.
- Oades RD, Lasky-Su J, Christiansen H, Faraone SV, Sonuga-Barke EJ et al. 2008. The influence of serotonin- and other genes on impulsive behavioral aggression and cognitive impulsivity in children with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): Findings from a family-based association test (FBAT) analysis. *Behav. Brain Funct.* 4:48.
- Ogdie MN, MacPhie IL, Minassian SL, Yang M, Fisher SE et al. 2003. A genomewide scan for attention-deficit/hyperactivity disorder in an extended sample: suggestive linkage on 17p11. *Am. J. Hum. Genet.* 72(5):1268-79.
- Onaivi ES. 2009. Cannabinoid receptors in brain: pharmacogenetics, neuropharmacology, neurotoxicology, and potential therapeutic applications. *Int. Rev. Neurobiol.* 88:335-69.
- O'Neill MF, Heron-Maxwell CL, Shaw G. 1999. 5-HT₂ receptor antagonism reduces hyperactivity induced by amphetamine, cocaine, and MK-801 but not D1 agonist C-APB. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 63(2):237-43.
- Ouellet-Morin I, Wigg KG, Feng Y, Dionne G, Robaey P et al. 2008. Association of the dopamine transporter gene and ADHD symptoms in a Canadian population-based sample of same-age twins. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 147B(8):1442-9.
- Palmason H, Moser D, Sigmund J, Vogler C, Hanig S et al. 2010. Attention-deficit/hyperactivity disorder phenotype is influenced by a functional catechol-O-methyltransferase variant. *J. Neural Transm.* 117(2):259-67.
- Paloyelis Y, Asherson P, Mehta MA, Faraone SV, Kuntsi J. 2010. DAT1 and COMT Effects on Delay Discounting and Trait Impulsivity in Male Adolescents with Attention Deficit / Hyperactivity Disorder and Healthy Controls. *Neuropsychopharmacology.* 35 (12) :2414-26.
- Pardi F, Lewis CM, Whittaker JC. 2005. SNP selection for association studies: maximizing power across SNP choice and study size. *Ann Hum Genet.* 69(Pt 6):733-46.

- Payton A, Holmes J, Barrett JH, Hever T, Fitzpatrick H et al. 2001. Examining for association between candidate gene polymorphisms in the dopamine pathway and attention-deficit hyperactivity disorder: a family-based study. *Am. J. Med. Genet.* 105(5):464-70.
- Pereira Pde A, Romano-Silva MA, Bicalho MA, De Marco L, Correa H et al. 2011. Association between tryptophan hydroxylase-2 gene and late-onset depression. *Am J Geriatr Psychiatry.* 19(9):825-9.
- Pliszka SR, McCracken JT, Maas JW. 1996. Catecholamines in attention-deficit hyperactivity disorder: current perspectives. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 35(3):264-72.
- Polanczyk G, Zeni C, Genro JP, Guimaraes AP, Roman T 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):218-24.
- Polanczyk G, Bigarella MP, Hutz MH, Rohde LA. 2010. Pharmacogenetic approach for a better drug treatment in children. *Curr. Pharm. Des* 16(22):2462-73.
- Ponce G, Hoenicka J, Rubio G, Ampuero I, Jimenez-Arriero MA et al. 2003. Association between cannabinoid receptor gene (CNR1) and childhood attention deficit/hyperactivity disorder in Spanish male alcoholic patients. *Mol. Psychiatry* 8(5):466-7.
- Prince JB. 2006. Pharmacotherapy of attention-deficit hyperactivity disorder in children and adolescents: update on new stimulant preparations, atomoxetine, and novel treatments. *Child Adolesc. Psychiatry. Clin. N. Am.* 15(1):13-50.
- Qian Q, Wang Y, Zhou R, Li J, Wang B et al. 2003. Family-based and case-control association studies of catechol-O-methyltransferase in attention deficit hyperactivity disorder suggest genetic sexual dimorphism. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 118B(1):103-9.
- Quist JF, Barr CL, Schachar R, Roberts W, Malone M et al. 2000. Evidence for the serotonin HTR2A receptor gene as a susceptibility factor in attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Mol. Psychiatry* 5(5):537-41.
- Quist JF, Barr CL, Schachar R, Roberts W, Malone M et al. 2003. The serotonin 5-HT1B receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Mol. Psychiatry* 8(1):98-102.
- Ramos-Quiroga JA, Bosch-Munso R, Castells-Cervello X, Nogueira-Morais M, Garcia-Gimenez E, Casas-Brugue M. 2006. Trastorno por deficit de atención con hiperactividad en adultos: una caracterización clínica y terapéutica. *Rev. Neurol.* 42(10):600-6.
- Ramos-Quiroga JA, Ribases-Haro M, Bosch-Munso R, Cormand-Rifa B, Casas M. 2007. Avances genéticos en deficit de Atención con hiperactividad. *Rev. Neurol.* 44 Suppl 3:S51-S52.
- Ramos N, Boni C, Downing AM, Close SL, Peters SL et al. 2009. A haplotype of the norepinephrine transporter (Net) gene Slc6a2 is associated with clinical response to atomoxetine in attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Neuropsychopharmacology* 34(9):2135-42.
- Reif A. 2010. Is NOS1 a genetic link between RLS and ADHD? *J. Psychiatr. Res.* 44(1):60-1.
- Retz W, Rosler M, Kissling C, Wiemann S, Hunnerkopf R et al. 2007. Norepinephrine transporter and catecholamine-O-methyltransferase gene variants and attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms in adults. *J. Neural Transm.* 115:323-9.

- Ribasés M, Ramos-Quiroga JA, Hervas A, Bosch R, Bielsa A et al. 2007. Exploration of 19 serotonergic candidate genes in adults and children with attention-deficit/hyperactivity disorder identifies association for 5HT2A, DDC and MAOB. *Mol. Psychiatry*. 44(Suppl 3): S51-S52.
- Ribasés M, Hervas A, Ramos-Quiroga JA, Bosch R, Bielsa A et al. 2008. Association Study of 10 Genes Encoding Neurotrophic Factors and Their Receptors in Adult and Child Attention-Deficit/ Hyperactivity Disorder. *Biol. Psychiatry* 15;63(10):935-45.
- Ribasés M, Bosch R, Hervas A, Ramos-Quiroga JA, Sanchez-Mora C et al. 2009a. Case-control study of six genes asymmetrically expressed in the two cerebral hemispheres: association of BAIAP2 with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol. Psychiatry* 66(10):926-34.
- Ribasés M, Ramos-Quiroga JA, Hervas A, Bosch R, Bielsa A et al. 2009b. Exploration of 19 serotonergic candidate genes in adults and children with attention-deficit/hyperactivity disorder identifies association for 5HT2A, DDC and MAOB. *Mol. Psychiatry* 14(1):71-85.
- Richman LC, Ryan S, Wilgenbusch T, Millard T. 2004. Overdiagnosis and medication for attention-deficit hyperactivity disorder in children with cleft: diagnostic examination and follow-up. *Cleft Palate Craniofac. J.* 41(4):351-4.
- Riley B, Thiselton D, Maher BS, Bigdeli T, Wormley B et al. 2010. Replication of association between schizophrenia and ZNF804A in the Irish Case-Control Study of Schizophrenia sample. *Mol. Psychiatry* 15(1):29-37.
- Ring BJ, Gillespie JS, Eckstein JA, Wrighton SA. 2002. Identification of the human cytochromes P450 responsible for atomoxetine metabolism. *Drug Metab Dispos.* 30(3):319-23.
- Rocha FF, Alvarenga NB, Lage NV, Romano-Silva MA, Marco et al. 2011. Associations between polymorphic variants of the tryptophan hydroxylase 2 gene and obsessive-compulsive disorder. *La Rev Bras Psiquiatr.* 33(2):176-80.
- Roessner V, Sagvolden T, Dasbanerjee T, Middleton FA, Faraone SV et al. 2010. Methylphenidate normalizes elevated dopamine transporter densities in an animal model of the attention-deficit/hyperactivity disorder combined type, but not to the same extent in one of the attention-deficit/hyperactivity disorder inattentive type. *Neuroscience.* vol.167/4(1183-91), 1873-7544.
- Roman T, Schmitz M, Polanczyk G, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH. 2001. Attention-deficit hyperactivity disorder: a study of association with both the dopamine transporter gene and the dopamine D4 receptor gene. *Am. J. Med. Genet.* 105(5):471-8.
- Roman T, Schmitz M, Polanczyk GV, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH. 2002. Further evidence for the association between attention-deficit/hyperactivity disorder and the dopamine-beta-hydroxylase gene. *Am. J. Med. Genet.* 114(2):154-8.
- Roman T, Schmitz M, Polanczyk GV, Eizirik M, Rohde LA, 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(1):116-20.
- Ronai Z, Szantai E, Szmola R, Nemoda Z, Szekely A et al. 2004. A novel A/G SNP in the -615th position of the dopamine D4 receptor promoter region as a source of misgenotyping of the -616 C/G SNP. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 126(1):74-8.

- Ronald A, Simonoff E, Kuntsi J, Asherson P, Plomin R. 2008. Evidence for overlapping genetic influences on autistic and ADHD behaviours in a community twin sample. *J. Child Psychol. Psychiatry* 49(5):535-42.
- Rowe DC, Stever C, Giedinghagen LN, Gard JM, Cleveland HH et al. 1998. Dopamine DRD4 receptor polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder. *Mol. Psychiatry* 3(5):419-26.
- Rubinstein M, Phillips TJ, Bunzow JR, Falzone TL, Dziejczapolski G et al. 1997. Mice lacking dopamine D4 receptors are supersensitive to ethanol, cocaine, and methamphetamine. *Cell* 90(6):991-1001.
- Sanger F. 1975. The Croonian Lecture, 1975. Nucleotide sequences in DNA. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 191(1104):317-33.
- Sauer JM, Ring BJ, Witcher JW. 2005. Clinical pharmacokinetics of atomoxetine. *Clin. Pharmacokinet.* 44(6):571-90.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270(5235):467-70.
- Schmitz M, Denardin D, Silva TL, Pianca T, Roman T et al. 2006. Association between alpha-2a-adrenergic receptor gene and ADHD inattentive type. *Biol. Psychiatry* 60(10):1028-33.
- Seaman MI, Fisher JB, Chang F, Kidd KK. 1999. Tandem duplication polymorphism upstream of the dopamine D4 receptor gene (DRD4). *Am. J. Med. Genet.* 88(6):705-9.
- Seeger G, Schloss P, Schmidt MH. 2001. Functional polymorphism within the promotor of the serotonin transporter gene is associated with severe hyperkinetic disorders. *Mol. Psychiatry* 6(2):235-8
- Seneviratne C, Huang W, it-Daoud N, Li MD, Johnson BA. 2009. Characterization of a functional polymorphism in the 3' UTR of SLC6A4 and its association with drinking intensity. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 33(2):332-9.
- Servera M, Cardo E. 2007. Valor predictivo de los criterios del DSM-IV en el diagnóstico del trastorno por déficit de atención/hiperactividad y sus diferencias culturales. *Rev. Neurol.* 45(7):393-9.
- Shaw P, Eckstrand K, Sharp W, Blumenthal J, Lerch JP et al. 2007a. Attention-deficit/hyperactivity disorder is characterized by a delay in cortical maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104(49):19649-54.
- Shaw P, Gornick M, Lerch J, Addington A, Seal J et al. 2007b. Polymorphisms of the dopamine D4 receptor, clinical outcome, and cortical structure in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* 64(8):921-31.
- Shaw P, Lalonde F, Lepage C, Rabin C, Eckstrand K et al. 2009. Development of cortical asymmetry in typically developing children and its disruption in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* 66(8):888-96.
- Sheehan K, Lowe N, Kirley A, Mullins C, Fitzgerald M et al. 2005. Tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) gene variants associated with ADHD. *Mol. Psychiatry* 10(10):944-9.
- Shen R, Fan JB, Campbell D, Chang W, Chen J et al. 2005. High-throughput SNP genotyping on universal bead arrays. *Mutat. Res.* 573(1-2):70-82.
- Shibata H, Joo A, Fujii Y, Tani A, Makino C. et al. 2001. Association study of polymorphisms in the GluR5 kainate receptor gene (GRIK1) with schizophrenia. *Psychiatr Genet.* 11(3):139-44.

- Short EJ, Fairchild L, Findling RL, Manos MJ. 2007. Developmental and subtype differences in behavioral assets and problems in children diagnosed with ADHD. *J Atten Disord.* 11(1):28-36.
- Singh MK, DelBello MP, Kowatch RA, Strakowski SM. 2006. Co-occurrence of bipolar and attention-deficit hyperactivity disorders in children. *Bipolar. Disord.* 8(6):710-20.
- Smalley SL, Kustanovich V, Minassian SL, Stone JL, Ogdie MN et al. 2002. Genetic linkage of attention-deficit/hyperactivity disorder on chromosome 16p13, in a region implicated in autism. *Am. J. Hum. Genet.* 71(4):959-63.
- Smith, K. M., Daly, M., Fischer, M., Yiannoutsos, C. T., Bauer, L., Barkley, R., et al. 2003. Association of the dopamine beta hydroxylase gene with attention deficit hyperactivity disorder: genetic analysis of the Milwaukee longitudinal study. *Am J Med Genet BNeuropsychiatr Genet* 119, 77-85.
- Smoller JW, Biederman J, Arbeitman L, Doyle AE, Fagerness J et al. 2006. Association between the 5HT1B receptor gene (HTR1B) and the inattentive subtype of ADHD. *Biol. Psychiatry* 59(5):460-7.
- Solanto M, Newcorn J, Vail L, Gilbert S, Ivanov I, Lara R. 2009. Stimulant drug response in the predominantly inattentive and combined subtypes of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* 19(6):663-71.
- Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S et al. 1993. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362(6418):318-24.
- Sonuga-Barke EJ, Lasky-Su J, Neale BM, Oades R, Chen W et al. 2008. Does parental expressed emotion moderate genetic effects in ADHD? An exploration using a genome wide association scan. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 147B(8):1359-68.
- Spear BB, Heath-Chiozzi M, Huff J. 2001. Clinical application of pharmacogenetics. *Trends Mol. Med.* 7(5):201-4.
- Spencer T, Biederman J, Wilens T. 2000. Pharmacotherapy of attention deficit hyperactivity disorder. *Child Adolesc. Psychiatr. Clin. N. Am.* 9(1):77-97.
- Spencer T, Heiligenstein JH, Biederman J, Faries DE, Kratochvil CJ et al. 2002a. Results from 2 proof-of-concept, placebo-controlled studies of atomoxetine in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J. Clin. Psychiatry* 63(12):1140-7.
- Spencer TJ, Biederman J, Wilens TE, Faraone SV. 2002b. Novel treatments for attention-deficit/hyperactivity disorder in children. *J. Clin. Psychiatry* 63 Suppl 12:16-22.
- Spencer TJ. 2004. Adult attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychiatr Clin North Am.* 27(2):XI-XII.
- Spencer TJ. 2006. ADHD and comorbidity in childhood. *J. Clin. Psychiatry.* 67 Suppl 8:27-31.
- Staner L, Uyanik G, Correa H, Treméau F, Monreal J et al. 2002. A dimensional impulsive-aggressive phenotype is associated with the A218C polymorphism of the tryptophan hydroxylase gene: a pilot study in well-characterized impulsive inpatients. *Am. J. Med. Genet.* 114(5):553-7.
- Stawicki JA, Nigg JT, von Eye A. 2006. Family psychiatric history evidence on the nosological relations of DSM-IV ADHD combined and inattentive subtypes: new data and meta-analysis. *J Child Psychol Psychiatry.* 47(9):935-45.
- Stein MA, Waldman ID, Sarampote CS, Seymour KE, Robb AS et al. 2005. Dopamine transporter genotype and methylphenidate dose response in children with ADHD. *Neuropsychopharmacology* 30(7):1374-82.

- Stein MA, McGough JJ. 2008. The pharmacogenomic era: promise for personalizing attention deficit hyperactivity disorder therapy. *Child Adolesc. Psychiatr. Clin. N. Am.* 17(2):475-xii.
- Steinhausen HC. 2009. The heterogeneity of causes and courses of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Acta Psychiatr. Scand.* 120(5):392-9.
- Stahl S.M. 2002. *Psicofarmacologia esencial*. Ed Ariel. Barcelona.
- Stergiakouli E, Thapar A. 2010. Fitting the pieces together: current research on the genetic basis of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 6:551-60.
- Sunahara RK, Guan HC, O'Dowd BF, Seeman P, Laurier LG et al. 1991. Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature* 350(6319):614-9.
- Swanson JM, Kinsbourne M, Nigg J, Lanphear B, Stefanatos GA, Volkow N, et al. 2007. Etiologic subtypes of attention-deficit/hyperactivity disorder: brain imaging, molecular genetic and environmental factors and the dopamine hypothesis. *Neuropsychol Rev* 17(1):39-59.
- Syed Z, Dudbridge F, Kent L. 2007. An investigation of the neurotrophic factor genes GDNF, NGF, and NT3 in susceptibility to ADHD. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 144(3):375-8.
- Szantai E, Szmola R, Sasvari-Szekely M, Guttman A, Ronai Z. 2005. The polymorphic nature of the human dopamine D4 receptor gene: a comparative analysis of known variants and a novel 27 bp deletion in the promoter region. *BMC. Genet.* 6(1):39.
- Szobot CM, Roman T, Hutz MH, Genro JP, Shih MC et al. 2010. Molecular imaging genetics of methylphenidate response in ADHD and substance use comorbidity. *Synapse.* 65(2):154-9.
- Tang Y, Buxbaum SG, Waldman I, Anderson GM, Zabetian CP et al. 2006. A single nucleotide polymorphism at DBH, possibly associated with attention-deficit/hyperactivity disorder, associates with lower plasma dopamine beta-hydroxylase activity and is in linkage disequilibrium with two putative functional single nucleotide polymorphisms. *Biol. Psychiatry* 60(10):1034-8.
- Tejedor D, Castillo S, Mozas P, Jimenez E, Lopez M et al. 2005. Reliable low-density DNA array based on allele-specific probes for detection of 118 mutations causing familial hypercholesterolemia. *Clin. Chem.* 51(7):1137-44.
- Thakur GA, Grizenko N, Sengupta SM, Schmitz N, Joober R. 2010. The 5-HTTLPR polymorphism of the serotonin transporter gene and short term behavioral response to methylphenidate in children with ADHD. *BMC. Psychiatry* 10:50.
- Thapar A, Langley K, Owen MJ, O'Donovan MC. 2007. Advances in genetic findings on attention deficit hyperactivity disorder. *Psychol. Med.* 37(12):1681-92.
- Tharoor H, Lobos EA, Todd RD, Reiersen AM. 2007. Association of dopamine, serotonin, and nicotinic gene polymorphisms with methylphenidate response in ADHD. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 147B(4):527-30.
- 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):527-30.
- Todd RD, Neuman RJ, Lobos EA, Jong YJ, Reich W, Heath AC. 2001. Lack of association of dopamine D4 receptor gene polymorphisms with ADHD subtypes in a population sample of twins. *Am. J. Med. Genet.* 105(5):432-8.

- Todd RD, Lobos EA, Sun LW, Neuman RJ. 2003. Mutational analysis of the nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit gene in attention deficit/hyperactivity disorder: evidence for association of an intronic polymorphism with attention problems. *Mol. Psychiatry* 8(1):103-8.
- Todd RD, Huang H, Smalley SL, Nelson SF, Willcutt EG et al. 2005. Collaborative analysis of DRD4 and DAT genotypes in population-defined ADHD subtypes. *J. Child Psychol. Psychiatry* 46(10):1067-73.
- Toplak ME, Pitch A, Flora DB, Iwenofu L, Ghelani K et al. 2009. The unity and diversity of inattention and hyperactivity/impulsivity in ADHD: evidence for a general factor with separable dimensions. *J. Abnorm Child Psychol.* 37(8):1137-50.
- Tranham-Davidson H, Vazdarjanova A, Dai R, Terry A, Bergson C. 2008. Up-regulation of calcyon results in locomotor hyperactivity and reduced anxiety in mice. *Behav. Brain Res.* 189(2):244-9.
- Tripp G, Wickens JR. 2009. Neurobiology of ADHD. *Neuropharmacology* 57(7-8):579-89.
- Turic D, Langley K, Mills S, Stephens M, Lawson D et al. 2004. Follow-up of genetic linkage findings on chromosome 16p13: evidence of association of N-methyl-D aspartate glutamate receptor 2A gene polymorphism with ADHD. *Mol. Psychiatry* 9(2):169-73.
- Turic D, Langley K, Williams H, Norton N, Williams NM et al. 2005. A family based study implicates solute carrier family 1-member 3 (SLC1A3) gene in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol. Psychiatry* 57(11):1461-6.
- Uebel H, Albrecht B, Asherson P, Borger NA, Butler L et al. 2010. Performance variability, impulsivity errors and the impact of incentives as gender-independent endophenotypes for ADHD. *J. Child Psychol. Psychiatry* 51(2):210-8.
- Valdizan JR, Izaguerri-Gracia AC. 2009. Trastorno por déficit de atención/hiperactividad en adultos. *Rev. Neurol.* 48 Suppl 2:S95-S99.
- Van der Meulen EM, Bakker SC, Pauls DL, Oteman N, Kruitwagen CL et al. 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):1074-80.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ et al. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291(5507):1304-51.
- Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Sudhof TC, Wernig M. 2010. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463(7284):1035-41.
- Vitalis T, Cases O, Callebert J, Launay JM, Price DJ et al. 1998. Effects of monoamine oxidase A inhibition on barrel formation in the mouse somatosensory cortex: determination of a sensitive developmental period. *J. Comp Neurol.* 393(2):169-84.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Gatley SJ, Logan J, Ding YS, Hitzemann R, Pappas N. 1998. Dopamine transporter occupancies in the human brain induced by therapeutic doses of oral methylphenidate. *Am J Psychiatry.* 155(10):1325-31.
- Vrijenhoek T, Buizer-Voskamp JE, van dS, I, Strengman E, Sabatti C et al. 2008. Recurrent CNVs disrupt three candidate genes in schizophrenia patients. *Am. J. Hum. Genet.* 83(4):504-10.
- Waldman HB, Perlman SP. Children with attention deficit disorder and learning disability: findings from the First National Study. *J. Dent Child (Chic).* 2004 May-Aug;71(2):101-4.
- Waldman ID, Gizer IR. 2006. The genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Clin. Psychol. Rev.* 26(4):396-432.

- Walitza S, Renner TJ, Dempfle A, Konrad K, Wewetzer C et al. 2005. Transmission disequilibrium of polymorphic variants in the tryptophan hydroxylase-2 gene in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol. Psychiatry* 10(12):1126-32.
- Wang E, Ding YC, Flodman P, Kidd JR, Kidd KK et al. 2004. The genetic architecture of selection at the human dopamine receptor D4 (DRD4) gene locus. *Am. J. Hum. Genet.* 74(5):931-44.
- Wang Y, Wang Z, Yao K, Tanaka K, Yang Y et al. 2008. Lack of association between the dopamine transporter gene 3' VNTR polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder in Chinese Han children: case-control and family-based studies. *Kobe J. Med. Sci.* 53(6):327-33.
- Wellcome Trust Case Control Consortium. 2007. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447(7145):661-78.
- Wernicke C, Smolka M, Gallinat J, Winterer G, Schmidt LG, Rommelspacher H. 2002. Evidence for the importance of the human dopamine transporter gene for withdrawal symptomatology of alcoholics in a German population. *Neurosci Lett.* 15;333(1):45-8.
- Wigg K, Zai G, Schachar R, Tannock R, Roberts W et al. 2002. Attention deficit hyperactivity disorder and the gene for dopamine Beta-hydroxylase. *Am. J. Psychiatry* 159(6):1046-8.
- Wigg KG, Takhar A, Ickowicz A, Tannock R, Kennedy JL et al. 2006. Gene for the serotonin transporter and ADHD: no association with two functional polymorphisms. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 141B(6):566-70.
- Willcutt EG, Pennington BF, Duncan L, Smith SD, Keenan JM et al. 2010. Understanding the complex etiologies of developmental disorders: behavioral and molecular genetic approaches. *J. Dev. Behav. Pediatr.* 31(7):533-44.
- Winsberg BG, Comings DE. 1999. Association of the dopamine transporter gene (DAT1) with poor methylphenidate response. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 38(12):1474-7.
- Wilens T, McBurnett K, Stein M, Lerner M, Spencer T, et al. 2005 ADHD treatment with once-daily OROS methylphenidate: final results from a long-term open-label study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 44(10):1015-23.
- Wood AC, Neale MC. 2010. Twin studies and their implications for molecular genetic studies: endophenotypes integrate quantitative and molecular genetics in ADHD research. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 49(9):874-83.
- Xu M, Hu XT, Cooper DC, Moratalla R, Graybiel AM et al. 1994. Elimination of cocaine-induced hyperactivity and dopamine-mediated neurophysiological effects in dopamine D1 receptor mutant mice. *Cell* 79(6):945-55.
- Xu C, Schachar R, Tannock R, Roberts W, Malone M et al. 2001. Linkage study of the alpha2A adrenergic receptor in attention-deficit hyperactivity disorder families. *Am. J. Med. Genet.* 105(2):159-62.
- Xu X, Knight J, Brookes K, Mill J, Sham P et al. 2005. DNA pooling analysis of 21 norepinephrine transporter gene SNPs with attention deficit hyperactivity disorder: no evidence for association. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 134(1):115-8.
- Xu X, Mill J, Sun B, Chen CK, Huang YS et al. 2009. Association study of promoter polymorphisms at the dopamine transporter gene in Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *BMC Psychiatry* 9:3.
- Yang L, Wang YF, Li J, Faraone SV. 2004. Association of norepinephrine transporter gene with methylphenidate response. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 43(9):1154-8.

- Yang JW, Jang WS, Hong SD, Ji YI, Kim DH et al. 2008. A case-control association study of the polymorphism at the promoter region of the DRD4 gene in Korean boys with attention deficit-hyperactivity disorder: evidence of association with the -521 C/T SNP. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 32(1):243-8.
- Young CE, Arima K, Xie J, Hu L, Beach TG et al. 1998. SNAP-25 deficit and hippocampal connectivity in schizophrenia. *Cereb. Cortex* 8(3):261-8.
- Zandi PP, Judy JT. 2010. The promise and reality of pharmacogenetics in psychiatry. *Psychiatr. Clin. North Am.* 33(1):181-224.
- Zeni CP, Guimaraes AP, Polanczyk GV, Genro JP, Roman T et al. 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(3):391-4.
- Zhou K, Chen W, Buitelaar J, Banaschewski T, Oades RD et al. 2008a. Genetic heterogeneity in ADHD: DAT1 gene only affects probands without CD. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 147B(8):1481-7.
- Zhou K, Dempfle A, Arcos-Burgos M, Bakker SC, Banaschewski T et al. 2008b. Meta-analysis of genome-wide linkage scans of attention deficit hyperactivity disorder. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 147B(8):1392-8.
- Zhu HJ, Patrick KS, Yuan HJ, Wang JS, Donovan JL et al. 2008. Two CES1 gene mutations lead to dysfunctional carboxylesterase 1 activity in man: clinical significance and molecular basis. *Am. J. Hum. Genet.* 82(6):1241-8.
- Zhuang X, Oosting RS, Jones SR, Gainetdinov RR, Miller GW et al. 2001. Hyperactivity and impaired response habituation in hyperdopaminergic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98(4):1982-7.
- Zoroglu SS, Erdal ME, Alasehirli B, Erdal N, Sivasli E et al. 2002. Significance of serotonin transporter gene 5-HTTLPR and variable number of tandem repeat polymorphism in attention deficit hyperactivity disorder. *Neuropsychobiology* 45(4):176-81.

