

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:  
PSIQUIATRIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**A ASSOCIAÇÃO DE GENES DO SISTEMA NORADRENÉRGICO E  
A RESPOSTA CLÍNICA AO TRATAMENTO COM METILFENIDATO  
EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM TRANSTORNO DE  
DÉFICIT DE ATENÇÃO / HIPERATIVIDADE:  
UM ESTUDO DE FARMACOGENÉTICA**

GUILHERME VANONI POLANCZYK

ORIENTADOR  
PROF. DR. LUIS AUGUSTO PAIM ROHDE

SETEMBRO/2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:  
PSIQUIATRIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**A ASSOCIAÇÃO DE GENES DO SISTEMA NORADRENÉRGICO E A  
RESPOSTA CLÍNICA AO TRATAMENTO COM METILFENIDATO EM  
CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM TRANSTORNO DE  
DÉFICIT DE ATENÇÃO / HIPERATIVIDADE:  
UM ESTUDO DE FARMACOGENÉTICA**

Guilherme Vanoni Polanczyk

Orientador

Prof. Dr. Luis Augusto Paim Rohde

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, 30 de setembro de 2005.

## Catalogação-na-Publicação

P762 Polanczyk, Guilherme Vanoni

A Associação de genes do sistema noradrenérgico e a resposta clínica ao tratamento com metilfenidato em crianças e adolescentes com transtorno de déficit de atenção/hiperatividade: um estudo de farmacogenética / Guilherme Vanoni Polanczyk. – 2005.  
168 f. il.

Dissertação (mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.  
Orientador: Dr. Luis Augusto Paim Rohde.

1. Farmacogenética 2. Metilfenidato - Uso terapêutico 3. Polimorfismo (Genética) 4. Transtorno da Falta de Atenção com Hiperatividade 5. Criança 6. Adolescente I. Rohde, Luis Augusto Paim II. Título

NLM QV38

(Bibliotecária responsável: Elise Maria Di Domenico Coser – CRB-10/1577)

*"O velho ideal científico da episteme - do conhecimento absolutamente certo, demonstrável - provou ser um ídolo. A existência da objetividade científica torna inevitável que todo enunciado científico permaneça provisório para sempre, em ciência a interrogação feita à natureza não cessa: problemas novos surgem cujas respostas se renovam enquanto problemas".*

*Karl Popper*

*À Mariana,  
pelo amor, pela companhia e pelo incentivo,  
que conferem sentido a tudo.*

*Aos meus pais, Tânia e Mário,  
pelo exemplo, pelo amor e pela dedicação,  
que me moldam como ser humano.*

## **Agradecimentos**

Ao Professor Luis Augusto Rohde, exemplo de competência, energia, criatividade e de compromisso com a Universidade, com o desenvolvimento ético do conhecimento e com os pacientes. O convívio cotidiano e generoso que me oferece é um estímulo fundamental para o meu desenvolvimento como clínico e como pesquisador na área da Psiquiatria da Infância e Adolescência;

Às Professoras Tatiana Roman e Mara H. Hutz, pela disponibilidade em ensinar e em compartilhar o conhecimento;

Aos componentes do Programa de Déficit de Atenção/Hiperatividade (PRODAH), especialmente aos que estiveram envolvidos na coleta dos dados clínicos e laboratoriais deste estudo: Ana Paula Guimarães, Ana Soledade Graeff Martins, Cristian Zeni, Júlia Genro, Marcelo Schmitz, Maria Elisa Graeff, Silvia Martins, Silzá Tramontina e Victor Mardini;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) pelo apoio financeiro para a realização deste estudo;

A todos - familiares, amigos, colegas, professores, pacientes - que, de diversas formas, nas várias etapas da minha vida e da minha formação, contribuíram para o meu crescimento como ser humano e como profissional. Em especial, ao meu irmão Rafael, pelo apoio e incentivo constantes; ao Rodrigo Chazan e Victor Aranovich, pela convivência e amizade; aos meus sogros, Cláudio e Marisa, pelo carinho e entusiasmo; à Silvana Graeff, por me auxiliar a encontrar e a trilhar os caminhos para o meu desenvolvimento;

Às crianças e adolescentes que participaram deste estudo e que representam todas aquelas cujo sofrimento buscamos minorar com nosso trabalho, que só então adquire verdadeiro sentido.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	16
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 BASE CONCEITUAL.....	21
2.1 As bases neurobiológicas do Transtorno de Déficit de Atenção/ Hiperatividade.....	21
2.2 O mecanismo de ação do metilfenidato.....	25
2.3 A farmacogenética do Transtorno de Déficit de Atenção/ Hiperatividade.....	29
2.4 Estudos envolvendo genes do sistema dopaminérgico.....	30
2.5 Estudos envolvendo genes do sistema noradrenérgico.....	34
2.6 Estudos de interação gênica e varreduras genômicas.....	36
2.7 Estudos envolvendo técnicas de neuroimagem, polimorfismos genéticos e resposta à medicação.....	37
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
4 OBJETIVOS.....	52
4.1 Objetivo Principal.....	52
4.2 Objetivos Secundários.....	52
5 PROTEÇÃO DOS DIREITOS HUMANOS.....	53
6 ARTIGO 1.....	54
6.1 Versão em Português.....	54
6.2 Versão em Inglês.....	82
7 ARTIGO 2.....	108
8 CONCLUSÕES.....	131
ANEXO 1: Artigo de Revisão.....	134
ANEXO 2: Escala Swanson, Nolan e Pelham - versão IV (SNAP-IV).....	163
ANEXO 3: Escala de Avaliação Global de Crianças (CGAS).....	164

ANEXO 4: Escala de Efeitos Adversos de Barkley (SERS).....	165
ANEXO 5: Termo de Consentimento Pós-Informação.....	166



**LISTA DE ABREVIATURAS**

A	adenina
<i>ADRA2A</i>	gene para o receptor adrenérgico $\alpha$ 2A
ANOVA	análise de variância
C	citosina
cM	centiMorgan
<i>COMT</i>	gene para a enzima catecol-O-metiltransferase
COMT	enzima catecol-O-metiltransferase
CPF	córtex pré-frontal
CPT	teste contínuo de desempenho
DAT	proteína transportadora de dopamina
<i>DAT1</i>	gene para a proteína transportadora de dopamina
<i>DBH</i>	gene para a enzima dopamina- $\beta$ -hidroxilase
<i>DRD4</i>	gene para o receptor dopaminérgico D4
<i>DRD5</i>	gene para o receptor dopaminérgico D5
EEG	eletroencefalograma
fRM	ressonância magnética funcional
G	guanina
MFD	metilfenidato
NET	proteína transportadora de noradrenalina
<i>NET1</i>	gene para a proteína transportadora de noradrenalina
pb	pares de base
QTL	locos de caracter quantitativo
rCBF	fluxo sangüíneo cerebral regional
RSP	polimorfismo de sítio de restrição
SNP	polimorfismo de nucleotídeo único
SPECT	tomografia computadorizada por emissão de fóton único
T	timina
TDAH	transtorno de déficit de atenção/hiperatividade
VNTR	número variável de repetições em tandem

*5-HTT*

gene para a proteína transportadora de serotonina

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Interação dos sistemas catecolaminérgicos relacionados ao TDAH.....24

Figura 2. O sistema tônico-fásico de liberação da dopamina.....27

Artigo 1. Versão em Português.

Figura 1. Escores médios de desatenção da SNAP-IV durante o tratamento com metilfenidato de acordo com a presença do alelo G.....79

Figura 2. Efeito do alelo G sobre escores  $\Delta$  de desatenção da SNAP-IV a partir da avaliação inicial.....81

Artigo 1. Versão em Inglês.

Figure 1. Mean SNAP-IV inattentive scores during methylphenidate treatment according to the presence of G allele.....105

Figure 2. Effect of the G allele over  $\Delta$  SNAP-IV inattentive scores from baseline.....107

**LISTA DE TABELAS**

Artigo 1. Versão em Português.

Tabela 1. Características demográficas e clínicas dos sujeitos incluídos de acordo com a presença do alelo G.....78

Artigo 1. Versão em Inglês.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of included subjects according to the presence of G allele.....104

Artigo 2. Versão em Português.

Tabela 1. Características demográficas e clínicas dos sujeitos incluídos.....130

## RESUMO

### Introdução

O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) está associado a um impacto negativo em diversas esferas da vida dos indivíduos afetados e de suas famílias. Os prejuízos causados por este transtorno são minimizados de forma significativa pelo tratamento medicamentoso, principalmente pelo uso do metilfenidato (MFD), cujo mecanismo de ação não é completamente conhecido. Estudos pré-clínicos têm apontado para o sistema noradrenérgico como um dos principais alvos da ação do MFD. Há um número reduzido de estudos que avaliaram a associação de genes do sistema noradrenérgico à melhora dos sintomas do TDAH e à ocorrência de efeitos adversos com o tratamento com MFD.

### Objetivos

O presente estudo tem por objetivo avaliar a associação de polimorfismos localizados nos genes para o receptor adrenérgico  $\alpha 2A$  (*ADRA2A*), para a enzima dopamina- $\beta$ -hidroxilase (*DBH*) e para o transportador de noradrenalina (*NET1*) e a resposta clínica (em termos de melhora sintomatológica, melhora do funcionamento global e ocorrência de efeitos adversos) ao tratamento com MFD em crianças e adolescentes com TDAH.

### Métodos

Crianças e adolescentes diagnosticados com TDAH foram tratados com MFD e reavaliados no 1º e no 3º mês de uso da medicação. Nos três momentos, os pais relataram a ocorrência de sintomas de desatenção, hiperatividade-impulsividade e oposição através da Escala Swanson, Nolan e Pelham - versão IV (SNAP-IV) e de efeitos colaterais à medicação através da Escala de Efeitos Adversos de Barkley (SERS). O médico assistente avaliou o funcionamento global da criança através da Escala de Avaliação Global de Crianças (CGAS). Foram avaliados os polimorfismos *ADRA2A Mspl*, *DBH Taql* e *Hhal* e *NET1 Bsl*. Suas associações às medidas clínicas descritas foram analisadas através do método da análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas ou através do modelo de efeitos mistos. Foi avaliada ainda a associação da interação entre os polimorfismos *DBH Taql*, *DBH Hhal* e *NET1 Bsl* e a redução dos sintomas através da ANOVA.

## Resultados

Foram incluídos nas análises 106 indivíduos. Foi detectado um efeito significativo da interação entre a presença do alelo G no polimorfismo *ADRA2A Mspl* e o tratamento com MFD ao longo do tempo sobre os sintomas de desatenção após 1 mês ( $n=106$ ;  $F_{1,104} = 8.51$ ;  $P=0.004$ ) e 3 meses ( $n=106$ ;  $F_{2,198} = 4.30$ ;  $P=0.015$ ) de tratamento. Não houve associação entre este polimorfismo e os demais desfechos avaliados. Paradoxalmente, indivíduos homocigotos para o alelo A2 no polimorfismo *DBH Taql* apresentaram menor redução dos sintomas de hiperatividade-impulsividade após 1 mês ( $n=83$ ;  $F=7.13$ ;  $P=0.009$ ) e maior redução destes sintomas após 3 meses ( $n=80$ ;  $F=3.01$ ;  $P=0.05$ ) de tratamento com MFD do que indivíduos sem este genótipo. Não houve associação entre este

polimorfismo e os demais desfechos avaliados. Não foram detectadas associações significativas dos polimorfismos *DBH HhaI* e *NET1 BslI* e melhora de sintomas, melhora do funcionamento global ou ocorrência de efeitos adversos durante o tratamento com MFD ( $P>0.05$ ). Não foi demonstrado efeito da interação entre os polimorfismos avaliados sobre a resposta ao tratamento com MFD ( $P>0.05$ ).

### **Conclusão**

Este estudo demonstrou de forma consistente a participação do polimorfismo *MspI* do gene *ADRA2A* na redução de sintomas de desatenção com o tratamento com MFD durante o período de acompanhamento. As evidências clínicas encontradas corroboram dados bioquímicos, neurobiológicos e farmacológicos existentes e indicam a necessidade de mais estudos sobre a participação do sistema noradrenérgico no mecanismo de ação do MFD. Esforços conjuntos entre os diversos grupos de pesquisa devem ser postos em prática para que novas metodologias possam ser empregadas no tratamento do TDAH.

**Palavras-chave:** transtorno de déficit de atenção/hiperatividade, TDAH, metilfenidato, estimulantes, farmacogenética, farmacogenômica.

## ABSTRACT

### Introduction

Attention-Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) is associated with negative outcomes on several domains of affected individuals and their families' lives. Impairment is relieved by psychopharmacological treatment, mainly by methylphenidate (MPH), a medication with a mechanism of action not completely understood. Pre-clinical studies showed that noradrenergic system is an important target of MPH action. Few studies have assessed the effect of noradrenergic genes on improvement of symptoms and adverse events during MPH treatment.

### Objectives

The aim of this study was to evaluate the association between polymorphisms located at adrenergic  $\alpha$ 2A receptor gene (*ADRA2A*), dopamine- $\beta$ -hydroxylase gene (*DBH*), and norepinephrine transporter gene (*NET1*) and clinical response (in terms of improvement of symptoms, improvement of global functioning, and occurrence of adverse effects) to MPH treatment in children and adolescents with ADHD.

### Methods

Children and adolescents with diagnosis of ADHD were treated with MPH and re-evaluated after 30 and 90 days of its use. At baseline, first and third month of treatment, parents reported ADHD symptoms according to Swanson, Nolan, and Pelham scale - version IV (SNAP-IV) and adverse events according to Barkley's



Side Effects Rating Scale (SERS). Child and Adolescent Psychiatrists evaluated patients' global functioning according to Children's Global Assessment Scale (CGAS). *ADRA2A MspI*, *DBH TaqI* and *HhaI*, and *NET1 BstI* polymorphisms were assessed and their association with clinical outcomes above described was analysed by ANOVA for repeated measures and mixed-effects model. We investigated the effects of gene-to-gene interaction between *DBH TaqI*, *DBH HhaI*, and *NET1 BstI* polymorphisms on  $\Delta$  scores (pre-treatment score - post-treatment score) of the SNAP-IV total score using ANOVA.

## Results

One hundred and six patients were included in analyses. It was detected a significant effect of the interaction between the presence of the G allele at *ADRA2A MspI* polymorphism and treatment with MPH over time on inattentive scores was after 1 month ( $n=106$ ;  $F_{1,104} = 8.51$ ;  $P=0.004$ ) and 3 months ( $n=106$ ;  $F_{2,198} = 4.30$ ;  $P=0.015$ ) of treatment. There was no association between this polymorphism and others evaluated outcomes. Paradoxically, children and adolescents homozygous for A2 allele in *DBH TaqI* polymorphism achieved less reduction of hyperactive-impulsive symptoms after 1 month ( $n=83$ ;  $F=7.13$ ;  $P=0.009$ ) and greater reduction of these symptoms after 3 months ( $n=80$ ;  $F=3.01$ ;  $P=0.05$ ) of treatment with MPH than subjects without this genotype. There was no association between this polymorphism and others evaluated outcomes. There was no association between *DBH HhaI* and *NET1 BstI* polymorphisms and improvement of symptoms, improvement of global functioning, and occurrence of

adverse effects during treatment with MPH ( $P>0.05$ ). There was no interaction between evaluated polymorphisms and response to MPH treatment ( $P>0.05$ ).

### **Conclusion**

This study demonstrated consistently the participation of *ADRA2A MspI* polymorphism on improvement of inattentive symptoms with MPH treatment during the trial period. This clinical data supports biochemical, neurobiological and pharmacological data already published. Taken together, these evidences indicates the urge for further studies on the involvement of noradrenergic system on the mechanism of action of MPH. Multi-site collaborative efforts are needed so modern approaches can be applied on ADHD treatment.

**Key-words:** attention-deficit hyperactivity disorder, ADHD, methylphenidate, stimulants, pharmacogenetics, pharmacogenomics.

## 1 INTRODUÇÃO

O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) é um distúrbio mental caracterizado por sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade com início na infância (1). Entre crianças em idade escolar, a sua prevalência é de 3 a 6% (2;3), sendo que mais de 60% dos indivíduos persistem com sintomas durante a adolescência e a idade adulta (4). Uma revisão sistemática da literatura documentou a presença deste transtorno em todo o mundo, ocorrendo mínima participação da localização geográfica na variabilidade das estimativas da sua prevalência (5).

A validade do TDAH como uma síndrome comportamental com substrato neurobiológico robusto é fortemente sugerida por inúmeras investigações (6). Estudos familiares apontam para a grande importância de componentes genéticos na etiologia deste transtorno [para revisão, veja Faraone et al. 2005 (7)].

O TDAH está associado a um prejuízo significativo e persistente em diversas esferas da vida dos indivíduos e a um alto custo para a sociedade (8-12). O tratamento medicamentoso promove importante redução dos sintomas e dos prejuízos associados, como melhora do desempenho escolar, da auto-estima e do funcionamento familiar (13;14). As medicações estimulantes são a primeira escolha no tratamento deste transtorno, sendo utilizadas há aproximadamente 60 anos com este propósito (14). O metilfenidato (MFD) é o estimulante mais utilizado e estudado em todo o mundo e o único atualmente disponível no Brasil.

O seu mecanismo de ação não é completamente entendido, ainda que inúmeras pesquisas tenham demonstrado que atua predominantemente sobre as vias cerebrais dopaminérgica e noradrenérgica (15).

O TDAH caracteriza-se atualmente como uma das desordens médicas mais bem estudadas, com demonstrado impacto clínico e epidemiológico, forte base genética e neurobiológica e terapêutica efetiva disponível (8;14;16;17). Assim, a identificação de genes relacionados à resposta clínica ao MFD constitui-se em um avanço natural desta área do conhecimento, que permitirá um maior entendimento sobre este transtorno e poderá proporcionar benefícios futuros inestimáveis aos pacientes.

## **2 BASE CONCEITUAL<sup>1</sup>**

### **2.1 As bases neurobiológicas do Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade**

Nas últimas décadas, aspectos neuroquímicos, neuropsicológicos, da anatomia estrutural e da anatomia funcional cerebral de indivíduos com TDAH vêm sendo progressivamente entendidos (6). Paralelamente, há uma melhor caracterização dos mecanismos de ação das medicações utilizadas para o seu tratamento. O acúmulo destes conhecimentos contribui para o estudo e para o desenvolvimento de novas medicações e de ferramentas ou testes diagnósticos para o TDAH (6).

Os estudos de imagem estrutural cerebral avaliaram, predominantemente, crianças e adolescentes com TDAH. Os resultados destes estudos, de uma forma geral, são coincidentes e indicam que o volume cerebral total de indivíduos com TDAH, particularmente do hemisfério direito, é 3 a 5% menor do que de indivíduos controles até os 19 anos de idade, assim como o córtex pré-frontal (CPF) (18-20). Um corpo crescente de evidências sugere que, dentre as regiões subcorticais, a região dos gânglios da base - estriato (formado pelo caudato e putâmen) e globo pálido - desempenha um importante papel no TDAH (19). Castellanos et al. (18) demonstraram que as diferenças significativas quanto ao volume do caudato entre crianças com TDAH e controles diminuem ao longo do tempo, sendo esta região

---

Parte desta sessão foi publicada como artigo de revisão: Polanczyk G, Zeni C, Genro JP, Roman T, Hutz MH, Rohde LA. Attention-deficit hyperactivity disorder: advancing on pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 2005;6(3):225-34] (ANEXO 1)

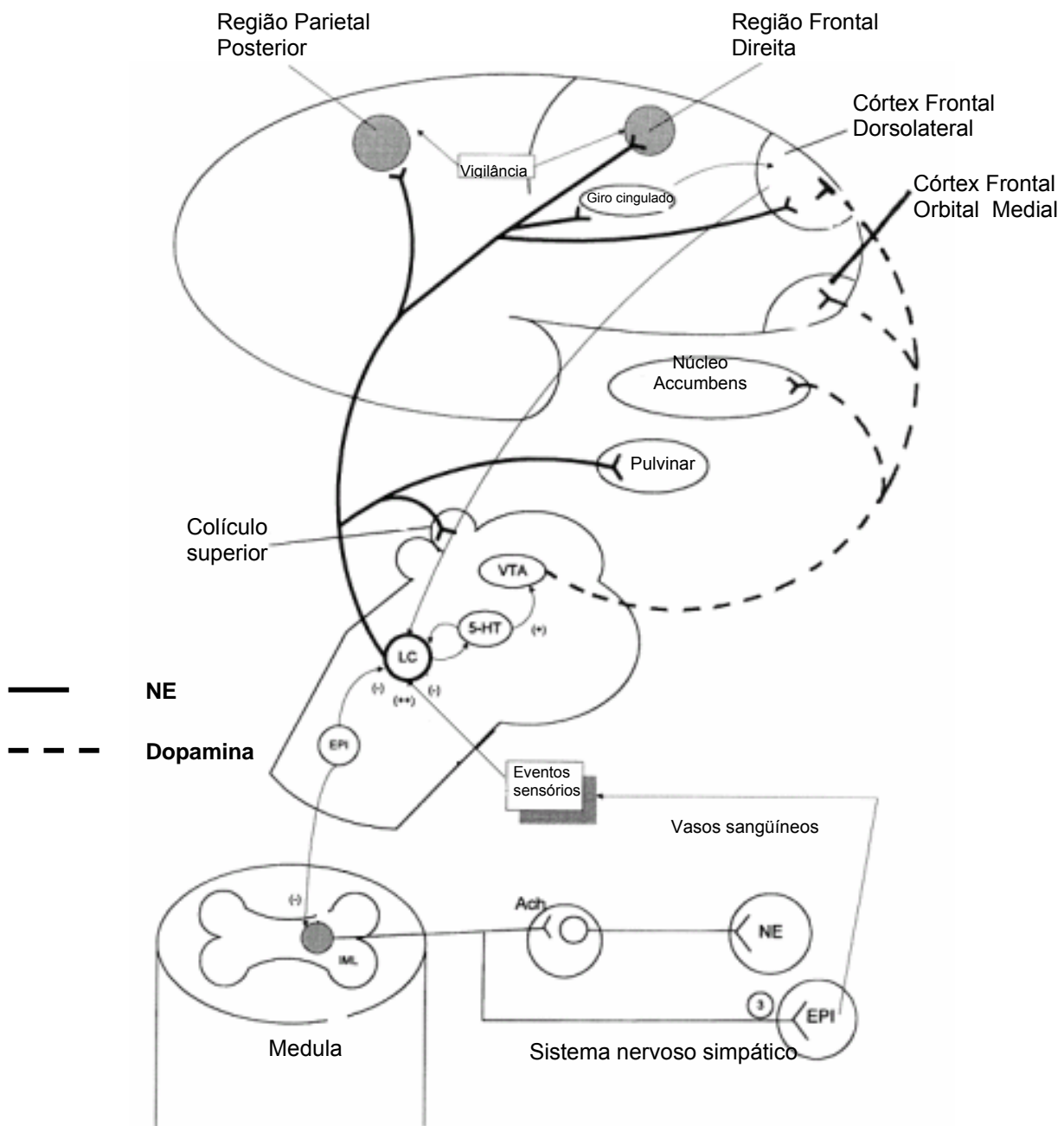
cerebral a única a apresentar uma "normalização" do seu volume. A importância do cerebelo no desempenho de funções cognitivas e a existência de conexões desta região com regiões corticais envolvidas na patofisiologia do TDAH também têm sido crescentemente reconhecidas (19-21).

Os estudos de anatomia funcional são consistentes com os achados estruturais, apontando anormalidades de ativação cerebral em circuitos fronto-subcorticais-cerebelares (22). Pacientes com TDAH apresentam redução do fluxo sanguíneo e do metabolismo na região do CPF, correspondendo a déficits cognitivos (6). Esta região é responsável pelas funções executivas, que compreendem a regulação da atenção, o planejamento, a iniciação e o monitoramento de ações e o controle de impulsos (23). Tarefas que exigem a integridade dessas funções são desempenhadas de forma deficitária pelos indivíduos com TDAH. Estudos neuropsicológicos demonstram que indivíduos afetados por este transtorno são facilmente distraídos, apresentam pouca capacidade para filtrar estímulos periféricos, dificuldade em manter a atenção e em organizar e planejar tarefas, pobre controle inibitório e hiperatividade motora (6;23).

Além do sistema atencional anterior, formado pelo giro cingulado e por suas conexões com estruturas pré-frontais, há um sistema posterior que também desempenha uma função crítica na regulação da atenção, filtrando estímulos secundários. Este sistema envolve os colículos superiores, o pulvinar do tálamo e o locus ceruleus, situado no tronco cerebral (24).

Os circuitos implicados no TDAH são particularmente ricos em catecolaminas (6). O sistema dopaminérgico consiste de dois subsistemas ascendentes primários: o sistema nigroestriatal, que vai da substância nigra ao estriato, e o sistema mesocorticolímbico, que se origina na área tegmentar ventral e alcança estruturas límbicas (como o núcleo acumbens) e sítios corticais, incluindo o CPF. Já o sistema noradrenérgico possui projeções que se originam principalmente do locus ceruleus e disseminam-se para todo o córtex cerebral, sendo particularmente densas no córtex frontal e no giro cingulado (Figura 1) (25).

O sistema dopaminérgico desempenha funções essenciais para a seleção, iniciação e manutenção de funções motoras, assim como regula funções cognitivas; exerce, ainda, um papel crucial nos mecanismos de recompensa cerebral, modulando a saliência de estímulos e a motivação relacionada a eventos (26). A hiperatividade motora foi associada com modelos animais hipodopaminérgicos (27;28) e hiperdopaminérgicos (29;30), indicando que alterações extremas poderiam produzir disfunções cognitivas e comportamentais. Assim, a hipótese dopaminérgica inicial de que diferentes anormalidades neste sistema (hipoatividade na região cortical e hiperatividade no caudato) explicariam os sintomas orientou um grande número de estudos neurobiológicos e genéticos, que em muito ampliaram o conhecimento sobre o TDAH (31;32). No entanto, a idéia do envolvimento de apenas um sistema neurotransmissor não parece ser suficiente para explicar a complexa patofisiologia do TDAH (6;15;23;33).



**Figura 1. Interação dos sistemas catecolaminérgicos relacionados ao TDAH.**

VTA: área tegmentar ventral; 5-HT: serotonina; LC: locus ceruleus; NE: norepinefrina; EPI: epinefrina; IML: coluna celular intermediolateral; Ach: acetilcolina. Figura adaptada de Pliszka SR, McCracken JT, Maas JW. Catecholamines in attention-deficit hyperactivity disorder: current perspectives. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1996; 35(3):264-272.



Além da dopamina, a noradrenalina apresenta uma forte influência sobre as funções do CPF (23). A noradrenalina atua principalmente através de receptores  $\alpha$ -2A, modulando a memória de trabalho e a inibição comportamental, assim como filtrando estímulos ambientais irrelevantes, o que protege contra a distratibilidade (23;34;35). Evidências de que medicações que agem especificamente sobre o sistema noradrenérgico, como atomoxetina, guanfacina, clonidina e antidepressivos tricíclicos, são eficazes na resolução de sintomas de desatenção e hiperatividade-impulsividade (14), têm fomentado a pesquisa sobre a participação deste sistema no mecanismo de ação do MFD e na patofisiologia do TDAH.

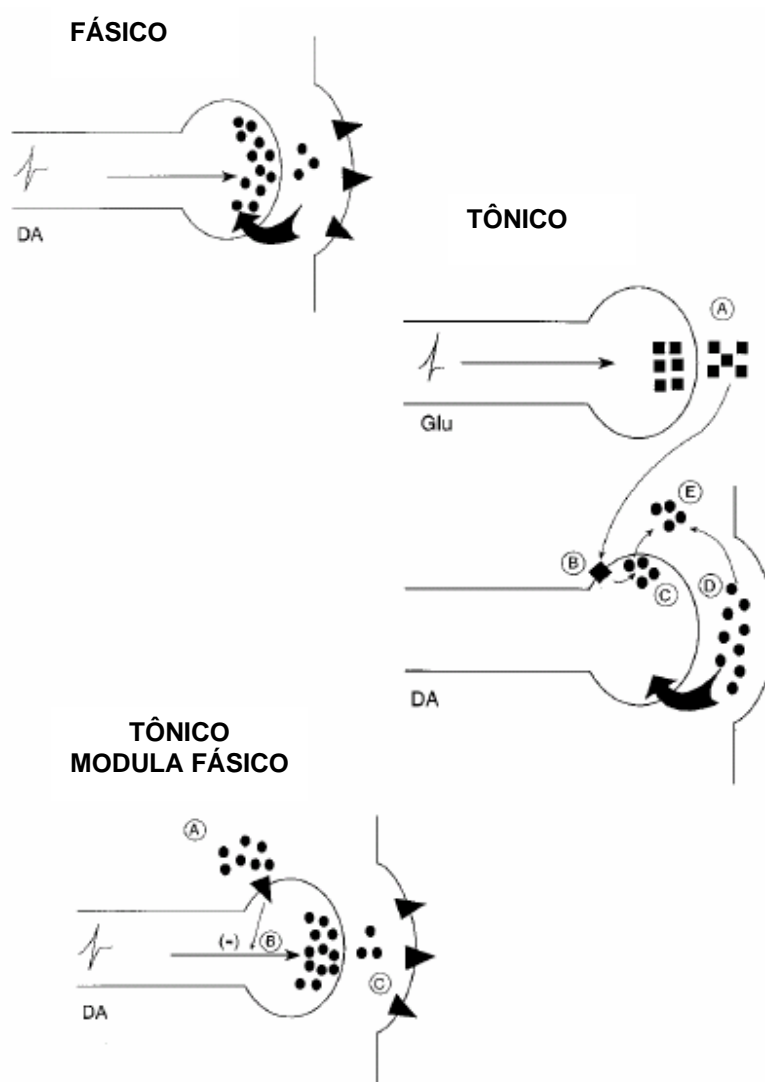
## **2.2 O mecanismo de ação do metilfenidato**

O mecanismo de ação do MFD, principal estimulante utilizado e único atualmente disponível no Brasil, ainda não é completamente entendido, embora existam evidências consistentes da sua ação sobre os sistemas dopaminérgico e noradrenérgico (36;37).

O MFD parece facilitar a transmissão catecolaminérgica, com efeitos positivos sobre o CPF (23). A sua ação mais estudada tem sido sobre o sistema dopaminérgico através do bloqueio do transportador de dopamina (DAT). Este transportador regula a concentração de dopamina na fenda sináptica, que é proporcional à magnitude e à duração da transmissão do impulso nervoso (38;39). O bloqueio do DAT provoca o aumento dos níveis de dopamina (40-42), amplificando o sinal que surge em resposta à transmissão nervosa (43). Estudos

que compararam indivíduos com e sem TDAH quanto aos níveis de DAT têm resultados controversos, indicando aumentos de 17% (44) e 70% (45) em indivíduos com TDAH, semelhança dos níveis de DAT (46) e redução de 18% em indivíduos com TDAH (37). No entanto, mesmo parecendo não haver uma uniformidade quanto aos níveis de DAT em indivíduos com TDAH quando comparados aos controles, a baixa disponibilidade de DAT nestes indivíduos parece estar relacionada à menor intensidade de efeitos positivos em resposta ao MFD (47).

Os níveis de dopamina extracelular também são regulados por diferenças individuais na liberação de dopamina e por estímulos ambientais, que obedecem a um sistema tônico-fásico de liberação (Figura 2). A liberação fásica da dopamina é aquela que ocorre em pico na fenda sináptica, provavelmente relacionada aos mecanismos de recompensa cerebral. A dopamina liberada desta forma é rapidamente removida deste espaço através de um sistema de recaptção de alta capacidade, impedindo que se difunda para o espaço extracelular. Em contraste, quando a dopamina é tonicamente ativada por estímulos excitatórios (através de disparos sustentados dos neurônios dopaminérgicos ou através de estimulação pré-sináptica destes terminais pelo glutamato), é liberada de tal forma que passa da fenda sináptica para o espaço extracelular em pequenas concentrações que variam muito pouco ao longo do tempo. Estas concentrações de dopamina são capazes de alcançar auto-receptores nos seus terminais, que são altamente



**Figura 2. O sistema tônico-fásico de liberação da dopamina.**

**Figura superior.** A liberação fásica é definida como a liberação em grande quantidade de dopamina (círculos) na fenda sináptica secundária a um potencial de ação disparado pelo neurônio dopaminérgico, capaz de estimular os receptores pós-sinápticos (triângulos). A dopamina é então rapidamente removida da fenda pelo seu transportador (DAT) (flechas grandes), antes que passe para o espaço extracelular. **Figura central.** A liberação tônica de dopamina é definida como a dopamina presente no espaço extracelular originada através da estimulação de receptores pré-sinápticos do terminal dopaminérgico (B) pelo glutamato (A, quadrados), causando uma liberação da dopamina pelo terminal sináptico (C). Uma pequena proporção de dopamina tônica é originada do alto fluxo de dopamina da fenda sináptica (D). A concentração de dopamina extra-sináptica (E), derivada destas fontes, é mantida baixa por diversas fontes regulatórias. **Figura inferior.** O nível de dopamina tônica no espaço extra-sináptico (A) é suficiente apenas para ativar auto-receptores dopaminérgicos que regulam a síntese e a liberação deste neurotransmissor (B), localizados no terminal dopaminérgico. Como consequência, há uma inibição da liberação fásica de dopamina na fenda sináptica (C). Figura adaptada de Grace A. The tonic/phasic model of dopamine system regulation and its implications for understanding alcohol and psychostimulant craving. *Addiction* 2000; 95 Suppl 2:S119-S128.

sensíveis e que regulam a sua liberação fásica, inibindo-a (48). Este sistema parece relacionar-se à variabilidade entre os indivíduos quanto a taxas de aumento de dopamina extracelular com níveis similares de bloqueio do DAT (40). Assim, o MFD induziria menores alterações sobre o sistema dopaminérgico em sujeitos com menor atividade sustentada (tônus) deste sistema, o que poderia ser uma explicação para diferenças de resposta clínica a esta medicação entre os indivíduos (48;49).

O conhecimento do importante papel da dopamina na atribuição de saliência a estímulos e na motivação para a realização de tarefas parece ser fundamental para o entendimento do mecanismo de ação do MFD no TDAH. O aumento de dopamina extracelular relacionado ao MFD parece ser dependente do contexto em que a medicação é utilizada (43). Foi demonstrado que o MFD associado a uma tarefa saliente aumentou significativamente os níveis de dopamina extracelular, o que não ocorreu quando foi associado a uma tarefa neutra ou quando a tarefa saliente foi associada a placebo (50). A medicação aumentou de forma significativa a percepção das tarefas como interessantes, excitantes e menos tediosas (50). O incremento dos níveis de dopamina causado pelo MFD quando associado à realização de uma atividade interessante parece provocar um aumento da saliência desta, motivando o indivíduo a engajar-se na sua realização, o que melhora os níveis de atenção e o desempenho (43).

Evidências indicam que a função dopaminérgica frontal é modulada tanto pela manipulação deste sistema como pela manipulação do sistema

noradrenérgico. Pequenas doses sistêmicas de MFD aumentam níveis de dopamina e noradrenalina no CPF de ratos (51). Uma vez que há relativamente baixos níveis de DAT no CPF, é provável que o aumento destes neurotransmissores ocorra através do bloqueio de proteínas transportadoras de noradrenalina (52). Estas proteínas captam quantidades excessivas de dopamina extracelular e a estimulação de receptores adrenérgicos  $\alpha$ 2A provoca a liberação de dopamina extracelular (53-55). Os receptores adrenérgicos  $\alpha$ 2A mediam os efeitos excitatórios do MFD em modelos animais (56). Sua ação positiva sobre a execução de tarefas relacionadas a funções do CPF é bloqueada pela co-administração de antagonistas de receptores dopaminérgicos D1 e, mais consistentemente, de antagonistas de receptores adrenérgicos  $\alpha$ 2A (57).

Este corpo de estudos vem corroborando o envolvimento do sistema noradrenérgico, particularmente de receptores adrenérgicos  $\alpha$ 2A, na ação positiva do MFD sobre os sintomas de desatenção e hiperatividade-impulsividade em sujeitos com TDAH, ainda que não existam evidências clínicas em humanos nesta direção.

### **2.3 A farmacogenética do Transtorno de Déficit de Atenção/ Hiperatividade**

A farmacogenética é o estudo da relação entre fatores hereditários e a variabilidade na resposta e nos efeitos adversos a um agente farmacológico entre diferentes indivíduos (58). Assim, tem o potencial de identificar, antes do início do tratamento medicamentoso, pacientes que não responderiam à medicação

proposta, que teriam uma resposta parcial, que necessitariam de uma dose elevada para atingir o efeito desejado, que seriam suscetíveis a determinados efeitos adversos ou que teriam melhor resposta com outra medicação.

Deve-se considerar que aproximadamente 30% das crianças inicialmente tratadas com MFD não apresentam resposta positiva (59;60). Além disso, os efeitos adversos a essa medicação, principalmente insônia e diminuição do apetite, surgem de forma variada entre os indivíduos e muitas vezes limitam o seu uso, obrigando o clínico a substituí-la por uma droga de segunda linha (60). Há poucos estudos acerca da farmacogenética do TDAH, ainda que seja esta uma importante área do conhecimento em desenvolvimento. Os estudos realizados se concentraram principalmente em genes com demonstrada participação na suscetibilidade para o TDAH, ainda que não necessariamente implicados no mecanismo de ação das drogas eficazes para o seu tratamento. Assim, genes para proteínas e receptores importantes para a ação do MFD são potencialmente interessantes do ponto de vista farmacogenético.

## **2.4 Estudos envolvendo genes do sistema dopaminérgico**

Os genes para o receptor dopaminérgico D4 (*DRD4*) e para o transportador de dopamina (*DAT1*) são os mais estudados, principalmente polimorfismos de número variável de repetições em tandem (VNTR). No gene *DRD4*, o VNTR é uma seqüência com 48 pares de base (pb) no terceiro éxon, que pode se repetir de duas a onze vezes. Este polimorfismo apresenta uma variabilidade étnica

considerável, sendo os alelos de duas, quatro e sete repetições os mais comuns nas diferentes populações. Uma recente meta-análise mostrou um efeito significativo do alelo de sete repetições no locus referido deste gene (61).

O principal polimorfismo do *DAT1* também é um VNTR com repetições com 40 pb na região 3'. Dez diferentes alelos podem ser encontrados, que variam de três a treze repetições. O alelo com dez repetições é o mais frequentemente encontrado em todo o mundo, sendo considerado o alelo de risco deste gene para o TDAH [para revisão, veja Roman et al. (62)].

Em relação aos estudos de farmacogenética envolvendo o *DAT1*, Winsberg e Comings (63) foram os pioneiros ao verificar a associação entre a homozigose para o alelo de dez repetições do *DAT1* e pior resposta ao MFD em trinta crianças afro-americanas com TDAH. Potenciais fatores de confusão entre os dois grupos de pacientes (com e sem homozigose para o alelo de dez repetições) não foram avaliados e a resposta à medicação foi definida de forma dicotômica (diminuição dos sintomas de TDAH em 50% ou mais), o que torna estes achados suscetíveis a viéses não identificados.

O achado de Winsberg e Comings (63) foi replicado em uma amostra de cinquenta meninos brasileiros (64). Em um estudo naturalístico cego de crianças com TDAH tratadas com MFD, foi avaliada a associação entre a resposta à medicação e o genótipo no referido polimorfismo do *DAT1*. Enquanto 75% (15/20) dos pacientes sem o genótipo 10/10 demonstraram uma melhora de pelo menos

50% nos sintomas cardinais do transtorno, apenas 47% (14/30) daquelas com o genótipo 10/10 alcançaram o mesmo nível de melhora com o uso desta medicação ( $P=0.04$ , uni-caudal). Além disso, o grupo de pacientes sem este genótipo apresentou uma melhora significativamente maior no funcionamento global do que o outro grupo ( $P<0.01$ , uni-caudal). Não houve diferença entre os grupos em relação à idade, etnia, nível educacional, nível de inteligência, sintomatologia basal do TDAH, comorbidades, doses iniciais e finais de MFD (64).

Embora os resultados sejam interessantes, tais estudos devem ser entendidos em um contexto mais amplo. Recentemente, diferentes grupos relataram achados diversos quando avaliaram o efeito do *DAT1* na resposta ao MFD em crianças com TDAH. Em uma amostra de 102 pacientes holandeses tratados com MFD, não foi encontrada associação entre a presença do alelo de dez repetições e a resposta a esta medicação (J.K. Buitelaar, comunicação pessoal). Além disso, Hamarman et al. (65) demonstraram que sujeitos com TDAH homocigotos para o alelo de dez repetições no *DAT1* ( $n=15$ ) e sujeitos com uma ou nenhuma cópia do alelo de dez repetições ( $n=30$ ) necessitaram de doses de MFD similares para a normalização dos sintomas (39 mg versus 38 mg, respectivamente;  $P=0.62$ ).

Kirley et al. (66) encontraram uma associação significativa entre o alelo de dez repetições e melhor resposta ao MFD em uma amostra de 119 crianças irlandesas com TDAH ( $\chi^2=7.92$ ;  $df=1$ ;  $P=0.005$ ). Stein et al. (67) evidenciaram uma associação entre pior resposta ao MFD e homocigose para o alelo de nove



repetições no *DAT1* em uma amostra de 43 crianças norte-americanas com TDAH.

Mais recentemente, Lott et al. (68) conduziram um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, com *crossover* com placebo e duas doses orais de d-amfetamina buscando avaliar os efeitos subjetivos da anfetamina através de medidas auto-respondidas em 96 voluntários normais. Em sujeitos com genótipo 9/9 e 10/10, a anfetamina esteve associada a aumento de ansiedade, euforia e sensação de "estar drogado", como esperado ( $P < 0.01$ ). Entretanto, sujeitos com genótipo 9/9 ( $n=8$ ) apresentaram, quando utilizaram anfetamina, efeitos subjetivos indistinguíveis daqueles apresentados durante o uso de placebo. Estes achados vão ao encontro daqueles relatados por Stein et al. (67) que apontam para a associação entre a homozigose para o alelo de nove repetições e pior resposta ao MFD.

Em relação aos estudos de farmacogenética envolvendo o *DRD4*, Tahir et al. (69) apresentaram uma evidência indireta da associação entre o alelo de sete repetições no *DRD4* e resposta ao MFD em pacientes com TDAH. Em uma amostra de 111 crianças turcas, a associação entre o alelo de sete repetições e o TDAH foi mais robusta em sujeitos considerados respondedores para a medicação. Achados similares foram detectados para o gene para o receptor dopaminérgico D5 (*DRD5*). Contudo, é importante ressaltar que neste estudo não houve controle para potenciais variáveis de confusão, o que torna difícil a interpretação desses achados.

Hamerman et al. (70) evidenciaram, em uma amostra de 45 crianças com TDAH, que aquelas com o alelo de sete repetições no *DRD4* não obtiveram a mesma normalização dos sintomas com doses de 50 mg/dia do que aquelas sem o alelo de sete repetições e que necessitaram 1.5 vezes maior dose de MFD para alcançar melhora dos sintomas ( $P=0.002$  e  $P<0.001$ , respectivamente). Todavia, Winsberg e Comings (63) não encontraram associação entre a presença do alelo de sete repetições no *DRD4* e a resposta ao MFD em 30 crianças afro-americanas com TDAH.

## 2.5 Estudos envolvendo genes do sistema noradrenérgico

Achados recentes indicam a participação de genes do sistema noradrenérgico, como o gene para a enzima dopamina- $\beta$ -hidroxilase (*DBH*) e para o receptor adrenérgico  $\alpha 2A$  (*ADRA2A*), na etiologia do TDAH (71-73).

No gene *DBH*, o polimorfismo mais estudado é o de sítio de restrição (RSP) *TaqI* no íntron 5, gerado pela transição T  $\rightarrow$  C. No *ADRA2A*, um RSP na região promotora do gene, originado por uma transversão C  $\rightarrow$  G na posição - 1291 foi avaliada por Roman et al. (73), que encontrou uma associação significativa entre este polimorfismo e a gravidade dos sintomas de desatenção. Recentemente, este achado foi replicado pelos mesmos pesquisadores em outra amostra de crianças e adolescentes provenientes da mesma população (74). Na investigação de Park et al. (72), além do polimorfismo mencionado, dois outros foram avaliados: *HhaI* na região 5'UTR e *DraI* na região 3'UTR do gene *ADRA2A*, com achados positivos.

Hamarman et al. (65) evidenciaram a ausência de efeito do polimorfismo *TaqI* no íntron 5 do *DBH* nas doses de MFD necessárias para normalizar os sintomas de TDAH (*A2-TaqI* presente: n=39; dose=39 mg/dia versus *A1-TaqI* ausente: n =6; dose =39 mg/dia;  $P=0.97$ ).

O transportador de noradrenalina (NET) é uma proteína envolvida na recaptação da noradrenalina e que, dada a sua ação sobre a memória, atenção e aprendizado, está implicada no TDAH (34). A atomoxetina, uma medicação eficaz no tratamento deste transtorno (75-77), é um inibidor altamente específico do NET, com mínima afinidade para outros receptores ou transportadores (78), o que torna o gene para o transportador de noradrenalina (*NET1*) um possível gene de suscetibilidade para este transtorno e de interesse para a farmacogenômica.

Barr et al. (79) avaliaram três polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (localizados no éxon 9, íntron 9 e íntron 13) em uma amostra de 122 famílias com TDAH, não tendo encontrado evidências de associação dos polimorfismos estudados e o TDAH. McEvoy et al. (80) avaliaram dois SNPs localizados no íntron 7 e no íntron 9 em famílias irlandeses, não encontrando, também, evidências de associação com o TDAH. De Luca et al. (81) avaliaram um diferente SNP no íntron 9 em 128 famílias nucleares, com achados negativos. Xu et al. (82) não encontraram evidências de associação entre 21 SNPs presentes no *NET1* e o diagnóstico de TDAH do tipo combinado. Porém, indicaram uma tendência de associação entre três polimorfismos localizados nos íntrons 8, 10 e 15 e presença de TDAH, que não foi significativa após o ajuste estatístico para o número de

marcadores analisados. Bobb et al. (83) avaliaram 20 polimorfismos em 12 diferentes genes e a sua associação com TDAH. Os dois polimorfismos avaliados no *NET1*, localizados nos íntrons 8 e 10, foram aqueles que apresentaram uma tendência estatística à associação descrita por Xu et al. (82). Bobb et al. (83) demonstraram transmissão preferencial do alelo C do polimorfismo rs998424 e do alelo T do polimorfismo rs3785157 nos probandos com TDAH, indicando a associação entre este gene e o TDAH. O número reduzido de estudos realizados avaliando o *NET1* e os resultados encontrados indicam a necessidade de replicações dos achados.

O único estudo publicado até o momento que avaliou a associação entre um polimorfismo no *NET1* e resposta ao MFD em crianças e adolescentes com TDAH foi realizado na China. Yang et al. (84) avaliaram uma amostra de 45 crianças tratadas com MFD em doses de 0.45-0.60 mg/kg/dia. Os autores encontraram uma associação significativa entre o genótipo G1287A de um polimorfismo localizado no éxon 9 do *NET1* e resposta ao MFD no escores para os sintomas de hiperatividade-impulsividade. Sujeitos com os genótipos G/G e G/A apresentaram maior redução destes sintomas ( $7.15 \pm 4.25$  e  $6.94 \pm 5.60$ ) do que sujeitos com genótipo A/A ( $2.13 \pm 4.29$ ) ( $P=0.01$ ).

## **2.6 Estudos de interação gênica e varreduras genômicas**

Uma vez que o TDAH é um distúrbio mental complexo, no qual inúmeros genes desempenham pequeno efeito (7), e que o MFD parece atuar sobre

diferentes áreas e sistemas cerebrais (15), os estudos de interação entre genes têm potencialmente maior poder para identificar polimorfismos relacionados à resposta ao MFD. Seeger et al. (85) relataram que pacientes com transtorno hipercinético que apresentavam o alelo de sete repetições no *DRD4* e homozigose para o alelo longo (L, inserção de uma seqüência de 44 pb na região promotora) do gene para o transportador de serotonina (*5-HTT*) mostraram menores escores no funcionamento global após tratamento com MFD.

Recentemente, Van der Meulen et al. (42) relataram o primeiro estudo de locos de caracteres quantitativos (QTL) no TDAH. Estes autores testaram a hipótese de ligação investigando 400 marcadores com uma distância média de 10 centiMorgan (cM) em pares de irmãos holandeses, visando a resposta ao MFD. A análise com Genehunter mostrou um escore  $Z=2.6$  no cromossomo 7, correspondendo a um LOD-score=2.63 em uma análise tradicional de Haseman-Elston. Picos adicionais com escores  $Z$  iguais a 2.74, 2.61 e 2.37 foram encontrados nos cromossomos 3, 5 e 9, respectivamente. Como indicaram os autores, devido ao pequeno tamanho amostral, mais estudos são necessários para demonstrar ligação com as regiões de maiores picos, já que o limiar para significância nestes estudos é, em geral, definido como um escore  $Z=4.1$  e um LOD-score=3.6.

## **2.7 Estudos envolvendo técnicas de neuroimagem, polimorfismos genéticos e resposta à medicação**

Devido à grande variabilidade fenotípica do TDAH, a identificação de endofenótipos tem um valor expressivo para o aumento da acurácia diagnóstica. Estudos de neuroimagem têm o potencial para facilitar a identificação destes marcadores (6). Neste sentido, estudos preliminares avaliaram a farmacogenética do TDAH e métodos eletroencefalográficos e de neuroimagem.

Em um estudo piloto naturalístico, Rohde et al. (86) avaliaram meninos com TDAH que nunca haviam sido medicados com MFD e que apresentaram resposta moderada ou importante ao tratamento com esta medicação. Foi evidenciado um maior fluxo sanguíneo cerebral regional (rCBF) nas áreas fronto-medial e de gânglios da base em crianças homozigotas para o alelo de dez repetições do *DAT1* do que em crianças não homozigotas após quatro dias de tratamento com MFD (para ambas áreas:  $P=0.02$ ). Além disso, foi detectada uma tendência de maior rCBF nas áreas frontais esquerda e direita em crianças com o genótipo 10/10 do que em crianças sem este genótipo (para ambas áreas:  $P=0.08$ ).

Recentemente, Cheon et al. (87) conduziram um protocolo sofisticado no qual utilizaram a tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) para avaliar a densidade do DAT, a homozigose para o alelo de dez repetições do *DAT1* e a resposta ao MFD em onze crianças coreanas com TDAH tipo combinado. Todos os sujeitos apresentavam apenas TDAH, nunca haviam utilizado MFD e foram tratados com esta medicação antes da realização do SPECT por aproximadamente oito semanas, com doses de até 0.7 mg/kg/dia. Os indivíduos com genótipo 10/10 ( $n=7$ ) apresentaram um aumento significativamente

maior na densidade do DAT nos gânglios da base do que aqueles sem este genótipo (n=4) ( $P<0.01$ ). Além disso, enquanto apenas 28.6% (2/7) das crianças homozigotas para o alelo de dez repetições apresentaram boa resposta (definida pelos autores como redução de 50% na sintomatologia em relação à pontuação basal) ao tratamento com MFD, 100% (4/4) das crianças sem o genótipo 10/10 apresentaram boa resposta ( $P=0.06$ ). Adicionalmente, as crianças com boa resposta ao tratamento com MFD apresentaram densidade do DAT significativamente menor em gânglios da base bilateralmente do que as crianças que não apresentaram tal nível de resposta ( $P<0.05$ ).

Os achados destes dois estudos vão ao encontro dos resultados de Winsberg e Comings (63) e Roman et al. (64) mencionados anteriormente. Estes dados, como grupo de evidências, parecem sugerir que, para doses similares de MFD, sujeitos homozigotos para o alelo de dez repetições do *DAT1* apresentam menor redução dos sintomas de desatenção e/ou hiperatividade-impulsividade do que indivíduos com outros genótipos. Considerando que a eficácia do MFD encontra-se provavelmente relacionada à inibição do DAT, um transportador mais ativo ou um aumento da densidade deste transportador na fenda sináptica poderia estar presente quando há dez cópias desta seqüência de 40 pb na região 3'UTR do locus *DAT1* (88). Esta hipótese é consistente com os estudos de Mill et al. (89), Fuke et al. (90) e Heinz et al. (91), que sugerem o aumento da expressão do *DAT1* ou da densidade do DAT na presença da homozigose para o alelo de dez repetições. Se esta hipótese é verdadeira, mais transportador de dopamina (ou um transportador mais ativo) estaria disponível em indivíduos 10/10 do que em

indivíduos sem este genótipo após o tratamento com doses similares de MFD, um excesso que seria capaz de recaptar a dopamina extracelular. Em outras palavras, menor quantidade de dopamina estaria disponível na fenda sináptica quando um aumento de densidade do transportador ou um transportador mais ativo fosse codificado. Uma vez que o efeito desejado do MFD inclui o aumento dos níveis extracelulares de dopamina, a resposta a esta droga em indivíduos 10/10 dependeria de maior liberação dopaminérgica nas regiões associadas com a memória de trabalho e com o comportamento inibitório (região frontal e gânglios da base). Esta hipótese também está de acordo com uma recente investigação que sugere que diferenças na resposta individual ao MFD são devidas, em parte, a diferenças individuais na liberação de dopamina (92).

Loo et al. (93) também apresentaram evidências de que polimorfismos no *DAT1* estariam associados aos efeitos do MFD no cérebro. Enquanto que em crianças com TDAH com genótipos 9/9 ou 9/10 (n=10) há aumento da fração  $\theta/\beta$  no eletroencefalograma (EEG) ativado pelo teste contínuo de desempenho (CPT), crianças com TDAH homozigotas para o alelo de dez repetições no *DAT1* (n=17) apresentaram um padrão oposto com tratamento com MFD (diminuição da fração  $\theta/\beta$ ). Estes achados sugerem que o polimorfismo no *DAT1* media alterações na atividade cerebral relacionada ao MFD.

Uma área menos explorada em estudos de farmacogenética relaciona-se à regulação da produção e do *turnover* de neurotransmissores em áreas de atuação das medicações ou próximo a elas. Devido à inativação que exerce sobre as catecolaminas, a catecol-O-metiltransferase (COMT) é uma importante enzima



reguladora da neurotransmissão dopaminérgica e noradrenérgica. Um polimorfismo comum em humanos está associado a uma variação de duas a três vezes da atividade enzimática da COMT, associando-se também à instabilidade térmica. Este fenômeno ocorre devido à uma substituição G → A no códon 158 do gene para a COMT (*COMT*), que resulta na substituição de uma valina por uma metionina (94). Subseqüentemente aos achados positivos sobre a associação entre este polimorfismo funcional do *COMT* e o TDAH (95), inúmeras outras investigações falharam em replicar estes dados (96;97) Mattay et al. (98) conduziram um estudo duplo-cego, com *crossover* (anfetamina e placebo), usando ressonância magnética funcional (fRM) para avaliar a função do córtex pré-frontal em 25 voluntários saudáveis genotipados para o polimorfismo no códon 158 do *COMT* (9 *val/val*, 10 *val/met*, e 6 *met/met*). A anfetamina aumentou a eficiência da função do córtex pré-frontal, avaliada através da fRM durante uma tarefa que envolvia a memória de trabalho em indivíduos com alto nível de atividade enzimática (com genótipo *val/val*). Estes indivíduos, presumivelmente, apresentavam níveis inferiores de dopamina sináptica na região pré-frontal em todos os níveis de dificuldade da tarefa. Em contraste, em sujeitos com baixa atividade enzimática (genótipo *met/met*), que tendem a apresentar uma função pré-frontal basal superior, a droga não apresentou efeitos sobre a eficiência cortical em tarefas leves a moderadas que envolviam a memória de trabalho. Ainda, o uso da anfetamina causou deterioração na eficiência cortical destes indivíduos quando eles envolveram-se em tarefas que exigiam alta participação da memória de trabalho. Este achado vai ao encontro de um recente estudo que sugere que o MFD aumenta a saliência de tarefas (50).

Considerando a importância do sistema noradrenérgico na patofisiologia do TDAH e no mecanismo de ação do MFD e o progressivo desenvolvimento da farmacogenética, é de grande relevância o estudo de genes deste sistema. No entanto, fomos capazes de localizar apenas dois estudos que avaliaram o efeito de genes do sistema noradrenérgico sobre a resposta ao tratamento com MFD. Foram avaliados o *NET1* (84) e o *DBH* (65) por estudos independentes e nenhum estudo avaliou o *ADRA2A*. Além disso, nenhum estudo avaliou a associação de polimorfismos com a ocorrência de efeitos adversos e há escassas evidências acerca da interação entre genes e resposta ao MFD. Desta forma, são necessários esforços no sentido de buscar preencher estas lacunas do conhecimento.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Diseases, fourth edition (DSM-IV). Washington, DC: APA, 1994.
- (2) Rohde LA, Biederman J, Busnello EA et al. ADHD in a school sample of Brazilian adolescents: a study of prevalence, comorbid conditions, and impairments. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1999; 38(6):716-722.
- (3) Faraone SV, Sergeant J, Gillberg C, Biederman J. The worldwide prevalence of ADHD: is it an American condition? *World Psychiatry* 2003; 2(2):104-113.
- (4) Wilens TE, Faraone SV, Biederman J. Attention-deficit/hyperactivity disorder in adults. *JAMA* 2004; 292(5):619-623.
- (5) Polanczyk G, Lima MS, Horta B, Rohde LA. The worldwide prevalence of ADHD: What are the real sources of variation in its estimates. A systematic review and meta-regression analysis. 16<sup>th</sup> World Congress of the International Association for Child and Adolescent Psychiatry and Allied Professions. Berlin, German; 2004.
- (6) Castellanos FX, Tannock R. Neuroscience of attention-deficit/ hyperactivity disorder: the search for endophenotypes. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3(8):617-628.
- (7) Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE et al. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 2005; 57(11):1313-1323.
- (8) National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Diagnosis and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2000; 39:182-193.
- (9) Klassen AF, Miller A, Fine S. Health-related quality of life in children and adolescents who have a diagnosis of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pediatrics* 2004; 114(5):e541-e547.
- (10) Leibson CL, Katusic SK, Barbaresi WJ, Ransom J, O'Brien PC. Use and costs of medical care for children and adolescents with and without attention-deficit/hyperactivity disorder. *JAMA* 2001; 285(1):60-66.
- (11) Lesesne C, Abramowitz A, Perou R, Brann E. Attention deficit/ hyperactivity disorder: A public health research agenda. <http://www.cdc.gov/ncbddd/adhd/dadphra.htm> 1999.
- (12) Mannuzza S, Klein RG, Bessler A, Malloy P, LaPadula M. Adult outcome of hyperactive boys. Educational achievement, occupational rank, and psychiatric status. *Arch Gen Psychiatry* 1993; 50(7):565-576.
- (13) Swanson JM, Kraemer HC, Hinshaw SP et al. Clinical relevance of the primary findings of the MTA: success rates based on severity of ADHD and ODD

symptoms at the end of treatment. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2001; 40(2):168-179.

(14) Biederman J, Spencer T, Wilens T. Evidence-based pharmacotherapy for attention-deficit hyperactivity disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 2004; 7(1):77-97.

(15) Solanto MV. Neuropsychopharmacological mechanisms of stimulant drug action in attention-deficit hyperactivity disorder: a review and integration. *Behav Brain Res* 1998; 94(1):127-152.

(16) Goldman LS, Genel M, Bezman RJ, Slanetz PJ. Diagnosis and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents. Council on Scientific Affairs, American Medical Association. *JAMA* 1998; 279(14):1100-1107.

(17) Dulcan M. Practice parameters for the assessment and treatment of children, adolescents, and adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. American Academy of Child and Adolescent Psychiatry. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1997; 36(10 Suppl):85S-121S.

(18) Castellanos FX, Lee PP, Sharp W et al. Developmental trajectories of brain volume abnormalities in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *JAMA* 2002; 288(14):1740-1748.

(19) Seidman LJ, Valera EM, Makris N. Structural brain imaging of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 2005; 57(11):1263-1272.

(20) Giedd JN, Blumenthal J, Molloy E, Castellanos FX. Brain imaging of attention deficit/hyperactivity disorder. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 931:33-49.

(21) Berquin PC, Giedd JN, Jacobsen LK et al. Cerebellum in attention-deficit hyperactivity disorder: a morphometric MRI study. *Neurology* 1998; 50(4):1087-1093.

(22) Bush G, Valera EM, Seidman LJ. Functional neuroimaging of attention-deficit/hyperactivity disorder: a review and suggested future directions. *Biol Psychiatry* 2005; 57(11):1273-1284.

(23) Arnsten AF, Li BM. Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biol Psychiatry* 2005; 57(11):1377-1384.

(24) Arnsten AF, Steere JC, Hunt RD. The contribution of alpha 2-noradrenergic mechanisms of prefrontal cortical cognitive function. Potential significance for attention-deficit hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry* 1996; 53(5):448-455.

(25) Martin JH. *Neuroanatomy: Text and Atlas*. New York: McGraw-Hill Medical, 2003.

- (26) Berridge KC, Robinson TE. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Brain Res Rev* 1998; 28(3):309-369.
- (27) Cardinal RN, Pennicott DR, Sugathapala CL, Robbins TW, Everitt BJ. Impulsive choice induced in rats by lesions of the nucleus accumbens core. *Science* 2001; 292(5526):2499-2501.
- (28) Shaywitz BA, Yager RD, Klopfer JH. Selective brain dopamine depletion in developing rats: an experimental model of minimal brain dysfunction. *Science* 1976; 191(4224):305-308.
- (29) Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 1996; 379(6566):606-612.
- (30) Viggiano D, Grammatikopoulos G, Sadile AG. A morphometric evidence for a hyperfunctioning mesolimbic system in an animal model of ADHD. *Behav Brain Res* 2002; 130(1-2):181-189.
- (31) Solanto MV. Dopamine dysfunction in AD/HD: integrating clinical and basic neuroscience research. *Behav Brain Res* 2002; 130(1-2):65-71.
- (32) Castellanos FX. Toward a pathophysiology of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Clin Pediatr* 1997; 36(7):381-393.
- (33) Spencer TJ, Biederman J, Wilens TE, Faraone SV. Overview and neurobiology of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychiatry* 2002; 63 Suppl 12:3-9.
- (34) Biederman J, Spencer T. Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) as a noradrenergic disorder. *Biol Psychiatry* 1999; 46(9):1234-1242.
- (35) Pliszka SR, McCracken JT, Maas JW. Catecholamines in attention-deficit hyperactivity disorder: current perspectives. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1996; 35(3):264-272.
- (36) Biederman J, Faraone SV. Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet* 2005; 366(9481):237-248.
- (37) Volkow ND, Fowler JS, Wang G, Ding Y, Gatley SJ. Mechanism of action of methylphenidate: insights from PET imaging studies. *J Atten Disord* 2002; 6 Suppl 1:S31-S43.
- (38) Seeman P, Madras BK. Anti-hyperactivity medication: methylphenidate and amphetamine. *Mol Psychiatry* 1998; 3(5):386-396.

- (39) Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS et al. Dopamine transporter occupancies in the human brain induced by therapeutic doses of oral methylphenidate. *Am J Psychiatry* 1998; 155(10):1325-1331.
- (40) Volkow ND, Wang G, Fowler JS et al. Therapeutic doses of oral methylphenidate significantly increase extracellular dopamine in the human brain. *J Neurosci* 2001; 21(2):RC121.
- (41) Uryu K, Minami K, Yanagihara N et al. Inhibition by neuromuscular blocking drugs of norepinephrine transporter in cultured bovine adrenal medullary cells. *Anesth Analg* 2000; 91(3):546-551.
- (42) Van der Meulen E, Bakker SC, Pauls DL, Sinke RJ, Buitelaar J. A genome-wide quantitative trait locus analysis on methylphenidate response rate in Dutch sib pairs with Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. Proceedings of the 16th World Congress of the International Association for Child and Adolescent Psychiatry and Allied Professions. Berlin, Germany, 2004.
- (43) Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Ding YS. Imaging the effects of methylphenidate on brain dopamine: new model on its therapeutic actions for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 2005; 57(11):1410-1415.
- (44) Krause KH, Dresel SH, Krause J, Kung HF, Tatsch K. Increased striatal dopamine transporter in adult patients with attention deficit hyperactivity disorder: effects of methylphenidate as measured by single photon emission computed tomography. *Neurosci Lett* 2000; 285(2):107-110.
- (45) Dougherty DD, Bonab AA, Spencer TJ, Rauch SL, Madras BK, Fischman AJ. Dopamine transporter density in patients with attention deficit hyperactivity disorder. *Lancet* 1999; 354(9196):2132-2133.
- (46) van Dyck CH, Quinlan DM, Cretella LM et al. Unaltered dopamine transporter availability in adult attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* 2002; 159(2):309-312.
- (47) Krause J, la FC, Krause KH, Ackenheil M, Dresel SH. Influence of striatal dopamine transporter availability on the response to methylphenidate in adult patients with ADHD. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2005.
- (48) Grace AA. The tonic/phasic model of dopamine system regulation and its implications for understanding alcohol and psychostimulant craving. *Addiction* 2000; 95 Suppl 2:S119-S128.
- (49) Volkow ND, Swanson JM. Variables that affect the clinical use and abuse of methylphenidate in the treatment of ADHD. *Am J Psychiatry* 2003; 160(11):1909-1918.

- (50) Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS et al. Evidence that methylphenidate enhances the saliency of a mathematical task by increasing dopamine in the human brain. *Am J Psychiatry* 2004; 161(7):1173-1180.
- (51) Berridge CW, Stalnaker TA. Relationship between low-dose amphetamine-induced arousal and extracellular norepinephrine and dopamine levels within prefrontal cortex. *Synapse* 2002; 46(3):140-149.
- (52) Bymaster FP, Katner JS, Nelson DL et al. Atomoxetine increases extracellular levels of norepinephrine and dopamine in prefrontal cortex of rat: a potential mechanism for efficacy in attention deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychopharmacology* 2002; 27(5):699-711.
- (53) Devoto P, Flore G, Pani L, Gessa GL. Evidence for co-release of noradrenaline and dopamine from noradrenergic neurons in the cerebral cortex. *Mol Psychiatry* 2001; 6(6):657-664.
- (54) Devoto P, Flore G, Saba P, Fa M, Gessa GL. Co-release of noradrenaline and dopamine in the cerebral cortex elicited by single train and repeated train stimulation of the locus coeruleus. *BMC Neurosci* 2005; 6(1):31.
- (55) Oades RD, Sadile AG, Sagvolden T et al. The control of responsiveness in ADHD by catecholamines: evidence for dopaminergic, noradrenergic and interactive roles. *Dev Sci* 2005; 8(2):122-131.
- (56) Andrews GD, Lavin A. Methylphenidate Increases Cortical Excitability via Activation of Alpha-2 Noradrenergic Receptors. *Neuropsychopharmacology* 2005; advance online publication doi:10.1038/sj.npp.1300818.
- (57) Arnsten AF, Dudley AG. Methylphenidate improves prefrontal cortical cognitive function through alpha2 adrenoceptor and dopamine D1 receptor actions: Relevance to therapeutic effects in Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Behav Brain Funct* 2005; 1(1):2.
- (58) Weinshilboum R. Inheritance and drug response. *N Engl J Med* 2003; 348(6):529-537.
- (59) Cantwell DP. Attention deficit disorder: a review of the past 10 years. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1996; 35(8):978-987.
- (60) Masellis M, Basile VS, Muglia P, Ozdemir V, Macciardi FM, Kennedy JL. Psychiatric pharmacogenetics: personalizing psychostimulant therapy in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Behav Brain Res* 2002; 130(1-2):85-90.
- (61) Faraone SV, Doyle AE, Mick E, Biederman J. 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* 2001; 158(7):1052-1057.

- (62) Roman T, Rohde LA, Hutz MH. Polymorphisms of the dopamine transporter gene: influence on response to methylphenidate in attention deficit-hyperactivity disorder. *Am J Pharmacogenomics* 2004; 4(2):83-92.
- (63) Winsberg BG, Comings DE. Association of the dopamine transporter gene (DAT1) with poor methylphenidate response. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1999; 38(12):1474-1477.
- (64) Roman T, Szobot C, Martins S, Biederman J, Rohde LA, Hutz MH. Dopamine transporter gene and response to methylphenidate in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pharmacogenetics* 2002; 12(6):497-499.
- (65) Hamarman S, Ulger C, Fossella J, Brimacombe M, Dermody J. Influence of dopamine genes on stimulant response in ADHD children. 50th Annual Meeting of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry. Miami, USA, 2003.
- (66) Kirley A, Lowe N, Hawi Z et al. 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* 2003; 121(1):50-54.
- (67) Stein MA, Sarampote C, Waldman I. Dopamine transporter genotype affects stimulants response according to parent ratings. Proceedings of the 49th Annual Meeting of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry. 7C. San Francisco, USA, 2002
- (68) Lott DC, Kim SJ, Cook EH, Jr., de WH. Dopamine transporter gene associated with diminished subjective response to amphetamine. *Neuropsychopharmacology* 2005; 30(3):602-609.
- (69) Tahir E, Yazgan Y, Cirakoglu B, Ozbay F, Waldman I, Asherson PJ. Association and linkage of DRD4 and DRD5 with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in a sample of Turkish children. *Mol Psychiatry* 2000; 5(4):396-404.
- (70) Hamarman S, Fossella J, Ulger C, Brimacombe M, Dermody J. 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* 2004; 14(4):564-574.
- (71) Roman T, Schmitz M, Polanczyk GV, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH. Further evidence for the association between attention-deficit/hyperactivity disorder and the dopamine-beta-hydroxylase gene. *Am J Med Genet* 2002; 114(2):154-158.
- (72) Park L, Nigg JT, Waldman ID et al. Association and linkage of alpha-2A adrenergic receptor gene polymorphisms with childhood ADHD. *Mol Psychiatry* 2005; 10(6):572-580.



(73) Roman T, Schmitz M, Polanczyk GV, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH. Is the alpha-2A adrenergic receptor gene (ADRA2A) associated with attention-deficit/hyperactivity disorder? *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2003; 120(1):116-120.

(74) Roman T, Polanczyk G, Zeni C, Genro J, Rohde L A, Hutz MH. Further evidence of the involvement of alpha 2A adrenergic receptor gene (ADRA2A) in inattentive dimensional scores of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 2005; *in press*.

(75) Biederman J, Heiligenstein JH, Faries DE et al. Efficacy of atomoxetine versus placebo in school-age girls with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pediatrics* 2002; 110(6):e75.

(76) Michelson D, Allen AJ, Busner J et al. Once-daily atomoxetine treatment for children and adolescents with attention deficit hyperactivity disorder: a randomized, placebo-controlled study. *Am J Psychiatry* 2002; 159(11):1896-1901.

(77) Michelson D, Faries D, Wernicke J et al. Atomoxetine in the treatment of children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder: a randomized, placebo-controlled, dose-response study. *Pediatrics* 2001; 108(5):E83.

(78) Spencer T, Biederman J, Wilens T et al. Effectiveness and tolerability of tomoxetine in adults with attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* 1998; 155(5):693-695.

(79) Barr CL, Kroft J, Feng Y et al. The norepinephrine transporter gene and attention-deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet* 2002; 114(3):255-259.

(80) McEvoy B, Hawi Z, Fitzgerald M, Gill M. No evidence of linkage or association between the norepinephrine transporter (NET) gene polymorphisms and ADHD in the Irish population. *Am J Med Genet* 2002; 114(6):665-666.

(81) De Luca V, Muglia P, Jain U, Kennedy JL. No evidence of linkage or association between the norepinephrine transporter (NET) gene MnlI polymorphism and adult ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2004; 124(1):38-40.

(82) Xu X, Knight J, Brookes K et al. 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* 2005; 134(1):115-118.

(83) Bobb AJ, Addington AM, Sidransky E et al. Support for association between ADHD and two candidate genes: NET1 and DRD1. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005; 134(1):67-72.

- (84) Yang L, Wang YF, Li J, Faraone SV. Association of norepinephrine transporter gene with methylphenidate response. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2004; 43(9):1154-1158.
- (85) Seeger G, Schloss P, Schmidt MH. Marker gene polymorphisms in hyperkinetic disorder--predictors of clinical response to treatment with methylphenidate? *Neurosci Lett* 2001; 313(1-2):45-48.
- (86) Rohde LA, Roman T, Szobot C, Cunha RD, Hutz MH, Biederman J. Dopamine transporter gene, response to methylphenidate and cerebral blood flow in attention-deficit/hyperactivity disorder: a pilot study. *Synapse* 2003; 48(2):87-89.
- (87) Cheon KA, Ryu YH, Kim JW, Cho DY. 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* 2005; 15(1):95-101.
- (88) Swanson JM, Flodman P, Kennedy J et al. Dopamine genes and ADHD. *Neurosci Biobehav Rev* 2000; 24(1):21-25.
- (89) Mill J, Asherson P, Browes C, D'Souza U, Craig I. Expression of the dopamine transporter gene is regulated by the 3' UTR VNTR: Evidence from brain and lymphocytes using quantitative RT-PCR. *Am J Med Genet* 2002; 114(8):975-979.
- (90) Fuke S, Suo S, Takahashi N, Koike H, Sasagawa N, Ishiura S. The VNTR polymorphism of the human dopamine transporter (DAT1) gene affects gene expression. *Pharmacogenomics J* 2001; 1(2):152-156.
- (91) Heinz A, Goldman D, Jones DW et al. Genotype influences in vivo dopamine transporter availability in human striatum. *Neuropsychopharmacology* 2000; 22(2):133-139.
- (92) Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS et al. Relationship between blockade of dopamine transporters by oral methylphenidate and the increases in extracellular dopamine: therapeutic implications. *Synapse* 2002; 43(3):181-187.
- (93) Loo SK, Specter E, Smolen A, Hopfer C, Teale PD, Reite ML. Functional effects of the DAT1 polymorphism on EEG measures in ADHD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2003; 42(8):986-993.
- (94) Lachman HM, Papolos DF, Saito T, Yu YM, Szumlanski CL, Weinshilboum RM. Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics* 1996; 6(3):243-250.
- (95) Eisenberg J, Mei-Tal G, Steinberg A et al. 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* 1999; 88(5):497-502.

(96) Barr CL, Shulman R, Wigg K et al. Linkage study of polymorphisms in the gene for myelin oligodendrocyte glycoprotein located on chromosome 6p and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet* 2001; 105(3):250-254.

(97) Payton A, Holmes J, Barrett JH et al. Examining for association between candidate gene polymorphisms in the dopamine pathway and attention-deficit hyperactivity disorder: a family-based study. *Am J Med Genet* 2001; 105(5):464-470.

(98) Mattay VS, Goldberg TE, Fera F et al. Catechol O-methyltransferase val158-met genotype and individual variation in the brain response to amphetamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(10):6186-6191.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Principal**

Avaliar a associação dos polimorfismos *ADRA2A MspI*, *DBH TaqI*, *DBH HhaI* e *NET1 BstI* e a melhora dos sintomas de desatenção, hiperatividade-impulsividade em crianças e adolescentes com TDAH tratados com MFD.

### **4.2 Objetivos Secundários**

Avaliar a associação dos polimorfismos estudados e a melhora do funcionamento global de crianças e adolescentes com TDAH tratados com MFD.

Avaliar a associação dos polimorfismos estudados e a ocorrência de efeitos adversos em crianças e adolescentes com TDAH tratados com MFD.

Avaliar a associação da interação dos polimorfismos estudados e a melhora dos sintomas de desatenção, hiperatividade-impulsividade em crianças e adolescentes com TDAH tratados com MFD.

## 5 PROTEÇÃO DOS DIREITOS HUMANOS

Foi realizado contato com os pais das crianças e adolescentes avaliados no Programa de Déficit de Atenção/Hiperatividade (PRODAH), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, entre dezembro/2002 e maio/2004 que preencheram os critérios de inclusão deste estudo.

Um médico pesquisador não envolvido no tratamento dos pacientes explicou aos pais os objetivos do estudo e assegurou a ausência de vinculação da concordância em participar deste à continuidade do tratamento. Foi solicitada assinatura do termo de consentimento pós-informação (ANEXO 5).

Posteriormente, foi coletado 5ml de sangue venoso das crianças ou adolescente. As amostras de sangue foram armazenadas de forma a assegurar que a identificação de cada participante fosse possível apenas para um pesquisador independente.

Os resultados serão apresentados em um encontro com os pais.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre como adendo a uma linha de pesquisa intitulada “Estudo do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade – Suscetibilidade Genética e Identificação de Genes Candidatos”, sob protocolo número 98201.

## 6 ARTIGO 1

### 6.1 Versão em Português

#### **Associação do gene para o receptor adrenérgico $\alpha$ 2A e melhora dos sintomas de desatenção com o tratamento com metilfenidato em crianças com Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade**

Guilherme Polanczyk; Cristian Zeni; Julia P. Genro; Ana Paula Guimarães; Tatiana Roman; Mara H. Hutz; Luis Augusto Rohde

**Contexto.** Estudos pré-clínicos têm demonstrado a relevância do receptor adrenérgico  $\alpha$ 2A sobre os processos atencionais e sobre o mecanismo de ação do metilfenidato (MFD). Inúmeras investigações sugerem que este gene desempenha um papel na etiologia do Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH), especialmente sobre a desatenção. Entretanto, a influência do gene para o receptor adrenérgico  $\alpha$ 2A (*ADRA2A*) sobre a resposta ao MFD em humanos não foi investigada até o momento.

**Objetivo.** Avaliar a associação do polimorfismo –1291 C>G do gene *ADRA2A* e resposta clínica ao tratamento com MFD em crianças e adolescentes com TDAH.

**Desenho.** Foi realizado um estudo farmacogenético entre 2002 e 2004 com um desenho quasi-experimental.

**Local de realização.** Programa de tratamento de TDAH em um hospital universitário no Brasil.

**Pacientes.** Cento e seis pacientes consecutivamente diagnosticados com TDAH foram genotipados para o polimorfismo *ADRA2A* –1291 C>G e incluídos nas análises.

**Intervenção.** Foi administrado MFD de curta ação em doses crescentes até que não fosse detectada melhora adicional ou até que efeitos adversos limitantes ocorressem.

**Medidas de desfecho.** A medida primária de desfecho foi a sub-escala de desatenção da Escala de Swanson, Nolan e Pelham - versão IV (SNAP-IV), pontuada pelos pais. Medidas secundárias de desfecho foram a sub-escala de hiperatividade da SNAP-IV e a Escala de Efeitos Colaterais de Barkley (SERS). As escalas foram aplicadas por psiquiatras da infância e adolescência cegos para o genótipo na avaliação inicial, em 1 e 3 meses de tratamento.

**Resultados.** Foi detectado um efeito significativo da interação entre a presença do alelo G e tratamento com MFD ao longo do tempo sobre os sintomas de desatenção durante os 3 meses de tratamento com MFD ( $n=106$ ;  $F_{2,198}=4.30$ ;  $P=0.015$ ).

**Conclusões.** Documentamos a influência do alelo G no polimorfismo –1291 C>G no *ADRA2A* sobre a melhora de sintomas de desatenção com o tratamento com MFD em crianças e adolescentes com TDAH. Este achado fornece uma evidência

clínica do envolvimento do sistema noradrenérgico na modulação da ação do MFD.

Este estudo foi parcialmente financiado por verbas concedidas pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil) (Projeto 471761/03-6) Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX, Brasil) e Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Procedência dos autores: Programa de Déficit de Atenção/Hiperatividade (PRODAH), Serviço de Psiquiatria da Infância e Adolescência, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil (Drs. Polanczyk, Zeni e Rohde). Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil (Sras. Genro e Guimarães e Dra. Hutz). Departamento de Ciências Morfológicas, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, Brasil (Dra. Roman).

Correspondência: Dr. Luis Augusto Rohde, Serviço de Psiquiatria da Infância e Adolescência, HCPA. Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre - RS, Brasil

Conflitos de interesse: O PRODAH recebe apoio de Bristol-Myers Squibb, Eli-Lilly, Janssen-Cilag e Novartis. Dr. Luis Augusto Rohde confere palestras ou é consultor das mesmas companhias.



## INTRODUÇÃO

O metilfenidato (MFD) tem sido utilizado no tratamento da desatenção, da hiperatividade e da impulsividade há mais de 50 anos.<sup>1</sup> Indivíduos com Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) apresentam benefícios clinicamente significativos com o tratamento com MFD, refletidos por uma diminuição robusta dos sintomas e por uma melhora da qualidade de vida.<sup>2</sup> Contudo, os seus mecanismos de ação não são completamente entendidos.<sup>3</sup>

O efeito do MFD sobre as vias dopaminérgica e noradrenérgica resulta em melhora das funções do córtex pré-frontal (CPF).<sup>4,5</sup> A ação mais estudada do MFD é o bloqueio de transportadores de dopamina (DAT), aumentando os níveis de dopamina (DA) sináptica e extra-celular e contribuindo para a transmissão do impulso nervoso.<sup>3</sup> Aumentando os níveis de DA, o MFD parece incrementar a saliência de eventos.<sup>6</sup> A ação do MFD sobre o sistema noradrenérgico é muito menos estudada. Foi demonstrado que a ativação deste sistema melhora o funcionamento do CPF em humanos e em animais.<sup>3-5,7</sup> O MFD bloqueia transportadores de noradrenalina<sup>3</sup> e, quando administrado em baixas doses por via oral, apresenta maior efeito sobre a noradrenalina (NE) do que sobre a DA em áreas subcorticais.<sup>8</sup> O receptor adrenérgico  $\alpha_2A$  é um componente fundamental do sistema noradrenérgico,<sup>7</sup> com um provável papel no mecanismo de ação do MFD demonstrado por estudos com modelos animais.<sup>9,10</sup> Mais ainda, agonistas dos receptores adrenérgico  $\alpha_2A$ , como a guanfacina e a clonidina, são eficazes no tratamento do TDAH.<sup>11</sup>

O gene para o receptor adrenérgico  $\alpha 2A$  (*ADRA2A*) está localizado no cromossomo 10q24-26. Um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) C>G localizado em -1291 (rs 1800544) cria um sítio para a endonuclease *MspI* na região promotora do gene, identificado por Lario et al.<sup>12</sup> Seis entre oito estudos que avaliaram a associação entre *ADRA2A* e TDAH sugeriram que este polimorfismo desempenha um papel na suscetibilidade para este transtorno.<sup>13-20</sup> Um papel específico para o polimorfismo -1291 C>G *ADRA2A* na dimensão de desatenção foi demonstrado por inúmeras destas investigações.<sup>15,18,20</sup>

Estudos farmacogenéticos buscam identificar genes associados com variações na eficácia e nos efeitos colaterais secundários a um regime medicamentoso.<sup>21,22</sup> A maior parte dos estudos de farmacogenética do TDAH focaram-se em genes potencialmente de suscetibilidade, principalmente do sistema dopaminérgico.<sup>23</sup> Apenas dois estudos avaliaram genes noradrenérgicos,<sup>24,25</sup> mas nenhum deteve-se na influência do *ADRA2A* nos desfechos associados ao tratamento com MFD.

O objetivo primário deste estudo foi avaliar a associação entre o polimorfismo -1291 C>G *ADRA2A* e a melhora clínica de sintomas de desatenção com o tratamento com MFD em crianças e adolescentes com TDAH. Em análises secundárias exploratórias, foi avaliado o efeito deste polimorfismo sobre sintomas de hiperatividade-impulsividade e ocorrência de efeitos adversos com uso de MFD.

## **MÉTODOS**

### **Delineamento**

Este é um estudo de farmacogenética com desenho quasi-experimental.

### **Sujeitos**

Foram convidados a participar do estudo as crianças e os adolescentes consecutivamente avaliados no Programa de Déficit de Atenção/Hiperatividade (PRODAH), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, durante dois anos, que retornaram para reavaliação pelo menos no 1º mês de tratamento. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital. Foi obtido consentimento por escrito dos pais e concordância verbal das crianças após esclarecimentos.

Os critérios de inclusão foram: a) diagnóstico de TDAH conforme os critérios do DSM-IV;<sup>26</sup> b) idade entre 4 e 17 anos; c) etnia branca; d) ausência de uso prévio de MFD ao longo da vida; e) dose de MFD prescrita na avaliação inicial  $\geq$  0.3 mg/kg/dia. Sujeitos que preencheram todos critérios diagnósticos de acordo com o DSM-IV exceto o critério do início do prejuízo (sintomas causando prejuízo antes dos 7 anos de idade) foram incluídos, uma vez que pesquisas recentes não corroboram a validade deste critério.<sup>27,28</sup>

### **Procedimentos diagnósticos e avaliações clínicas**

Os procedimentos diagnósticos adotados pelo PRODAH já foram extensamente descritos.<sup>29</sup> Brevemente, o diagnóstico de TDAH e das comorbidades foi estabelecido após um processo com três estágios: 1) entrevista

clínica semi-estruturada (Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children - Epidemiologic version [K-SADS-E]), 2) discussão diagnóstica em um comitê clínico, 3) avaliação clínica. Caso houvesse desacordo entre as avaliações, era conferida prioridade para os diagnósticos derivados da avaliação clínica.<sup>29</sup> As avaliações clínicas foram realizadas por psiquiatras da infância e adolescência no momento inicial, em 30 e 90 dias de tratamento com MFD.

Baseados em investigações prévias na nossa população que mostraram uma associação entre *ADRA2A* e escores de desatenção,<sup>15,18</sup> selecionamos a sub-escala de desatenção da Escala de Swanson, Nolan e Pelham - versão IV (SNAP-IV) como desfecho primário. A escala SNAP-IV é uma revisão do Questionário de Swanson, Nolan e Pelham (SNAP).<sup>30</sup> Os itens da SNAP-IV são pontuados de 0 a 3. Esta escala têm sido freqüentemente utilizada em investigações sobre o TDAH, inclusive aquelas desenhadas para avaliar intervenções clínicas.<sup>30</sup> A consistência interna da SNAP-IV varia de boa a excelente.<sup>31</sup> Em um estudo prévio, obtemos um coeficiente alfa de Cronbach = 0.74 para a escala completa (26 itens) em uma amostra independente. A escala foi aplicada por psiquiatras da infância e adolescência aos pais.

Medidas de desfecho secundárias incluíram a sub-escala de hiperatividade-impulsividade da SNAP-IV e a Escala de Efeitos Adversos de Barkley (SERS). A SERS lista 17 efeitos adversos associados com estimulantes. A gravidade de cada sintoma é pontuado de 0 a 9.<sup>33</sup>

### **Intervenção farmacológica**

Os pacientes foram tratados de acordo com o protocolo do Programa. As doses de MFD de curta ação foram aumentadas até que não fosse detectada melhora adicional ou até que surgissem efeitos adversos limitantes.<sup>29</sup> A medicação foi administrada preferencialmente duas vezes por dia (8 horas e após o almoço), embora fosse permitida uma dosagem extra no fim da tarde. Os psiquiatras eram cegos ao genótipo do paciente. As doses médias de MFD prescritas na avaliação inicial e na avaliação de 1<sup>o</sup> mês de tratamento foram de 0.5 e 0.65 mg/kg/dia, respectivamente.

### **Genotipagem**

Foi extraído DNA de alto peso molecular de linfócitos do sangue periférico através de um procedimento de *salting out*.<sup>34</sup> O polimorfismo -1291 C>G na região promotora do *ADRA2A* (rs 1800544) foi amplificado pela reação da cadeia da polimerase (PCR) através de *primers* e protocolos como descritos anteriormente.<sup>12</sup> Os amplicons de 522 pb foram digeridos com *MspI* por 3 horas a 37°C. Os fragmentos digeridos foram separados através da eletroforese através de gel de poliacrilamida a 10% em 1x tampão TBE por 2.5-3 horas a 160 V. Os géis foram corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultra-violeta. A digestão pela enzima *MspI* na região promotora resulta em quatro fragmentos constantes (5, 62, 116 e 165 pb). O alelo C (antigo M) é identificado como uma banda polimórfica de 174pb, refletindo a ausência do sítio *MspI*. A transversão C → G na posição -1,291 cria o sítio de restrição *MspI*. A presença deste sítio produz a perda do fragmento de 174 pb, resultando em bandas de 121 e 53 pb, que determina o alelo G (antigo m).<sup>26</sup>

## **Análises estatísticas**

Os pacientes foram comparados quanto a características demográficas, QI, subtipo de TDAH, comorbidades, uso prévio de medicação, escores basais nas medidas de desfecho e dose prescrita de MFD através do teste de  $\chi^2$  ou do teste exato de Fisher (para variáveis categóricas) e do teste *t* de Student (para variáveis contínuas com distribuição normal).

Análises das medidas primárias e secundárias foram realizadas através do modelo de efeitos mistos (MEM), que proporciona uma estrutura flexível para a análise de medidas repetidas e não é afetada por dados não disponíveis (devido à perda de seguimento, pôr exemplo).<sup>35-37</sup> Para cada análise, a estrutura de covariância que melhora se adaptava aos dados foi selecionada a partir do menor valor do critério de informação de Akaike (AIC).<sup>38</sup> Foram incluídos em todas as análises os seguintes fatores independentes: tratamento ao longo do tempo, grupo (definido como a presença do alelo G) e a interação entre ambos os fatores.

Potenciais variáveis de confusão a serem incluídas nos modelos foram definidas através da análise conceitual da literatura e/ou através de uma definição estatística (presença de associação com o fator em estudo e com o desfecho para um valor de  $P \leq 0.10$ ). As análises cujos desfechos foram escores da SNAP-IV foram restritas para pacientes com escores basais  $> 1$  na sub-escala da SNAP-IV, permitindo que houvesse suficiente possibilidade de melhora, estratégia implementada em investigações prévias.<sup>39,40</sup>

As análises foram conduzidas através do programa estatístico SPSS versão 12.0. Foi aceito um nível de significância de 5% em todas as análises (exceto para confundidores). Os testes foram bi-caudais.

## RESULTADOS

Durante o período de estudo, 111 famílias participaram do estudo e seus filhos preencheram os critérios de inclusão para a análise do desfecho primário (escores de desatenção na SNAP-IV). Cinco indivíduos não foram incluídos nas análises devido a dados inválidos na avaliação inicial (n=2), uso irregular de MFD (n=2) e problemas na genotipagem (n=1). Assim, 106 pacientes foram incluídos no estudo (com dados disponíveis referentes à avaliação inicial e ao 1º mês de tratamento). Após 90 dias de tratamento, 89 foram reavaliados. Adicionalmente, vinte e seis pacientes foram acessados na avaliação inicial e não foram incluídos neste protocolo (11 sujeitos foram encaminhados, pois viviam em cidades diferentes de nosso Estado. Quinze pacientes não retornaram para a avaliação de 1 mês). Em relação às características iniciais, não foram detectadas diferenças significativas entre sujeitos incluídos (n=106) e não incluídos (n=5+26=31) em relação a gênero, idade QI, subtipo de TDAH, perfil de comorbidades (transtornos de ansiedade, de humor, disruptivos do comportamento), escores de funcionamento global, escores da SNAP-IV (respondida por pais e professores) e doses prescritas de MFD ( $P>0.1$ ). Além disso, os 106 pacientes incluídos neste estudo não diferiram em relação às características referidas de todos os pacientes avaliados em nosso Programa de Outubro de 2002 a Fevereiro de 2006 (n=457).

As freqüências alélicas dos pacientes incluídos foram estimadas em 0.62 para o alelo C e em 0.38 para o alelo G. As freqüências genotípicas foram de 0.38 para os indivíduos C/C, 0.49 para os indivíduos G/C e 0.13 para os indivíduos G/G. Estas freqüências encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Devido à



baixa frequência de indivíduos homozigotos G/G, estes foram agrupados com aqueles com genótipo G/C. Assim, pacientes com alelo G foram comparados com indivíduos sem este alelo (homozigotos para o alelo C) com o objetivo de explorarmos o efeito da sua sobre os desfechos.

As características clínicas e demográficas dos indivíduos de acordo com a presença do alelo G estão relatadas na Tabela 1. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos em relação aos potenciais confundidores (características demográficas, QI, subtipo de TDAH, perfil de comorbidades, uso prévio de medicação, escores basais nas medidas avaliadas e doses prescritas de MFD). Além disso, nenhum potencial confundidor esteve associado com a presença do alelo G e com escores de desatenção na SNAP-IV ( $P \leq 0.10$ ).

No modelo composto pelos efeitos do tratamento ao longo do tempo, da presença do alelo G e da interação entre ambos, foi evidenciado um efeito significativo do tratamento ao longo do tempo sobre os escores de desatenção da SNAP-IV durante os três meses de tratamento ( $n=106$ ;  $F_{2,198} = 79.37$ ;  $P < 0.001$ ). Embora nenhum efeito do alelo G tenha sido detectado ( $n=106$ ;  $F_{1,118} = 0.67$ ;  $P = 0.41$ ), houve um efeito significativo da interação entre a presença do alelo G e tratamento ao longo do tempo sobre os escores de desatenção da SNAP-IV durante os três meses de tratamento ( $n=106$ ;  $F_{2,198} = 4.30$ ;  $P = 0.015$ ) (Figura 1). A estrutura auto-regressiva de primeira ordem foi a estrutura de covariância com os menores valores de AIC. Em análises secundárias, estimamos que este modelo foi capaz de explicar 30.4% da variância dos escores de desatenção; 0.24% foi

explicado pelo alelo G, 28.85% pelo tempo e 1.34% pela interação entre tempo e alelo.

Os dados apresentados na Figura 1 claramente sugerem que o maior efeito do tratamento ocorreu entre a avaliação inicial e o primeiro mês de tratamento em ambos os grupos, como esperado. De fato, a melhora ocorrida entre a avaliação inicial e o primeiro mês de tratamento ( $n=106$ ; Tamanho de Efeito=1.15) foi maior do que a melhora ocorrida entre o primeiro mês e o terceiro mês de tratamento ( $n=89$ ; Tamanho de Efeito=0.20). Assim, foram também avaliados os efeitos do tratamento ao longo do tempo, alelo G e tratamento ao longo do tempo X alelo G durante apenas o primeiro mês, através do MEM. A estrutura de simetria composta foi a estrutura de covariância com os menores valores de AIC. Como esperado, foram evidenciados efeitos significativos do tratamento ao longo do tempo ( $n=106$ ;  $F_{1,104} = 126.69$ ;  $P < 0.001$ ) e da interação entre a presença do alelo G e tratamento ao longo do tempo ( $n=106$ ;  $F_{1,104} = 8.51$ ;  $P = 0.004$ ) sobre os escores de desatenção da SNAP-IV. Não foi encontrado um efeito significativo da presença do alelo G ( $n=106$ ;  $F_{1,104} = 0.22$ ;  $P = 0.64$ ).

Foram explorados os efeitos do tratamento ao longo do tempo, da presença do alelo G e da interação entre ambos sobre os escores de desatenção da SNAP-IV do primeiro ao terceiro mês de tratamento utilizando os escores basais de desatenção como covariáveis através do MEM. Este procedimento foi realizado uma vez que foi detectada uma pequena diferença entre-grupos em relação aos escores basais de desatenção (embora maior que o limiar estabelecido,  $P < 0.1$ ). Nesta análise de MEM, a estrutura de simetria composta foi a estrutura de covariância com os menores valores de AIC. Foram detectados efeitos

significativos do tratamento ao longo do tempo ( $n=106$ ;  $F_{1,96.9} = 3.81$ ;  $P=0.05$ ), escores basais de desatenção ( $n=106$ ;  $F_{1,104} = 14.82$ ;  $P<0.001$ ) e presença do alelo G ( $n=106$ ;  $F_{1,104} = 5.46$ ;  $P=0.02$ ) sobre os escores de desatenção da SNAP-IV. Como esperado, não foi detectado um efeito significativo da interação entre a presença do alelo G e tratamento ao longo do tempo ( $n=106$ ;  $F_{1,96.9} = 0.61$ ;  $P=0.44$ ) uma vez que a maior magnitude de melhora ocorreu da avaliação inicial ao primeiro mês.

O efeito do alelo G sobre a diferença dos escores de desatenção da avaliação inicial ao 1º e 3º mês de tratamento foi simultaneamente analisado através do MEM. A estrutura Toeplitz foi aquela com os menores valores de AIC. Esta análise também demonstrou um efeito significativo do alelo G sobre os escores  $\Delta$  ( $n=106$ ;  $F_{1,101.9} = 6.6$ ;  $P=0.012$ ). Indivíduos com o alelo G alcançaram maior redução dos escores de desatenção do que indivíduos sem este alelo, da avaliação inicial ao 1º e ao 3º mês de tratamento (Figura 2).

Como esperado, foi detectado um efeito significativo do tratamento ao longo do tempo para os escores de hiperatividade-impulsividade durante os três meses de tratamento ( $n=83$ ;  $F_{2,155.6} = 62.1$ ;  $P<0.001$ ). Entretanto, não foram demonstrados efeitos significativos da interação entre a presença do alelo G e tratamento ao longo do tempo ( $n=83$ ;  $F_{2,155.6} = 0.61$ ;  $P=0.54$ ) bem como da presença do alelo G ( $n=83$ ;  $F_{1,81.3} = 0.05$ ;  $P=0.82$ ) sobre os escores de hiperatividade-impulsividade da SNAP-IV. A estrutura de simetria composta foi a estrutura de covariância com os menores valores de AIC.

Em relação aos efeitos adversos, a análise de MEM demonstrou um efeito do tratamento ao longo do tempo sobre os escores da SERS, como esperado ( $n=106$ ;

$F_{2,201.2} = 5.4$ ;  $P = 0.005$ ). Entretanto, não foram detectados efeitos significativos da presença do alelo G ( $n = 106$ ;  $F_{1,107.6} = 0.15$ ;  $P = 0.69$ ) ou da interação entre ambos os fatores ( $n = 106$ ;  $F_{2,201.2} = 0.71$ ;  $P = 0.49$ ) sobre estes escores durante os três meses de tratamento com MFD. A estrutura auto-regressiva de primeira ordem foi a estrutura de covariância com os menores valores de AIC.

## DISCUSSÃO

Como previamente demonstrado por inúmeros estudos,<sup>41,42</sup> detectamos um efeito clinicamente robusto do MFD sobre os sintomas do TDAH durante um tratamento de curto prazo. Além disso, demonstramos uma maior magnitude de melhora dos sintomas de desatenção com o tratamento com MFD já no primeiro mês de uso naquelas crianças e adolescentes com alelo G (genótipos G/G e G/C) no polimorfismo -1291 C>G *ADRA2A* quando comparadas com aquelas sem este alelo (genótipo C/C). Não temos conhecimento de estudos prévios que tenham investigado o papel do *ADRA2A* na resposta ao MFD.

Este achado vai ao encontro de estudos pré-clínicos com animais que forneceram evidências da contribuição do bloqueio do receptor adrenérgico  $\alpha 2A$  na reprodução de sintomas do TDAH e na alteração da resposta ao MFD. Arnsten e Dudley<sup>10</sup> estudaram o efeito do MFD em ratos realizando uma tarefa atencional. Os autores demonstraram que o MFD melhorou significativamente o desempenho nesta tarefa. Subseqüentemente, MFD e um antagonista do receptor adrenérgico  $\alpha 2A$  (idazoxan) foram co-administrados. O efeito de melhora no desempenho atencional promovido pelo MFD foi bloqueado por este antagonista, indicando a contribuição deste receptor para efeitos cognitivos positivos do MFD.

Na mesma direção de nossos achados, investigações de genética molecular sugerem um papel deste polimorfismo no *ADRA2A* sobre o TDAH. Em nosso primeiro estudo, encontramos uma associação entre o genótipo G/G no *ADRA2A* e escores de desatenção em uma amostra de 92 indivíduos com TDAH.<sup>15</sup> Em uma amostra independente subseqüente de crianças com este transtorno, a

associação entre os sintomas de desatenção e o genótipo G/G foi novamente detectada.<sup>18</sup> Achados similares foram também obtidos por Park et al.<sup>16</sup> Estes autores investigaram um possível papel do gene *ADRA2A* no TDAH avaliando três diferentes polimorfismos de nucleotídeos únicos, incluindo o -1291 C>G, por nós estudado. Um efeito significativo deste polimorfismo foi detectado através do TDT Quantitativo (QTDT) sobre as dimensões de desatenção e de hiperatividade-impulsividade, particularmente através do alelo G. Mais ainda, análises de haplótipos mostraram efeitos significativos deste polimorfismo através do TDT e do QTDT. Em ambos os casos, o alelo G -1291 C>G parece ter contribuído para um risco aumentado, especialmente quando considerados os sintomas de desatenção.

Estes achados prévios e os nossos resultados parecem sugerir que o gene *ADRA2A* está independentemente associado com o fenótipo do TDAH (dimensão de desatenção) e com a resposta ao MFD em relação aos escores de desatenção.

Assim, é fundamental entender a significância funcional potencial do polimorfismo -1291 C>G no gene *ADRA2A*. Belfer et al.<sup>43</sup> recentemente relataram que o *ADRA2A* é composto por um único bloco haplotípico. Este bloco é composto por nove diferentes polimorfismos de nucleotídeos únicos localizados entre as regiões 5' e 3' do *ADRA2A*, incluindo o polimorfismo -1291 C>G e uma troca de aminoácidos não-sinônima na posição 251, conhecida como sendo de relevância funcional para o receptor adrenérgico  $\alpha 2A$ . Como referido pelos autores, este bloco haplotípico é suficiente para capturar o conteúdo de informações, mesmo quando o único lócus funcional conhecido não fora incluído.

Em outras palavras, o polimorfismo -1291 C>G pode ter uma função própria na expressão e/ou função do *ADRA2A* ou pode ser um marcador associado a um outro locus funcional. Estas hipóteses devem ser exploradas por investigações futuras.

Demonstramos o efeito positivo da presença do alelo G no polimorfismo -1291 C>G no gene *ADRA2A* sobre a redução dos sintomas de desatenção durante o tratamento com MFD. Comings et al.<sup>44</sup> documentaram um efeito codominante do alelo G (G/G > G/C > C/C) em um grupo de sintomas de TDAH e TOD. Assim, é possível especular se a presença de dois alelos G (homozigose) conferiria um efeito adicional sobre a redução dos sintomas de desatenção. Não detectamos efeito adicional em análises preliminares [redução média de sintomas de desatenção da avaliação inicial ao 1º e ao 3º mês de tratamento, de acordo com o genótipo, foram, respectivamente: G/G= 0.69 (EP=0.14) e 0.80 (EP=0.22); G/C= 0.89 (EP=0.08) e 0.93 (EP=0.08); C/C= 0.49 (EP=0.9) e 0.67 (EP=0.09)]. Assim, também é possível que uma vez alcançado um limiar de ação com a presença de um alelo G, a presença do segundo alelo não seja relevante, hipótese compatível com o modelo dominante. Entretanto, o número reduzido de indivíduos com o genótipo G/G nesta amostra (n=14) limitou esta análise. Estudos sobre a significância funcional do polimorfismo -1291 C>G são necessários para explicar a natureza do seu potencial efeito.

É importante considerarmos possíveis limitações de um estudo naturalístico. Em primeiro lugar, não houve um grupo placebo neste estudo; dessa forma, não tivemos um controle interno para corrigirmos qualquer efeito do tempo (como regressão à média). A melhora dos sintomas em nossa amostra foi comparável

àquela previamente relatada em ensaios clínicos randomizados.<sup>45</sup> Embora um efeito placebo possivelmente tenha ocorrido em algum grau em nosso estudo e tenha diminuído o poder ao reduzir a precisão da medida da resposta à medicação, é improvável que o efeito placebo tenha estado sistematicamente relacionado ao polimorfismo avaliado. Além disso, minimizamos a chance de que a maior redução dos escores de desatenção com uso de MFD detectada em indivíduos com o alelo G fosse atribuída a outros fatores, uma vez que realizamos uma extensa avaliação de potenciais fatores de confusão entre os grupos, uma estratégia não realizada usualmente por estudos farmacogenéticos prévios do TDAH. Em segundo lugar, o MFD foi administrado sem controle de adesão pelos investigadores. Embora tenhamos sido capazes de identificar dois pacientes que fizeram uso irregular da medicação, não podemos excluir a possibilidade de que tenha ocorrido, de alguma forma, falta de adesão no restante da amostra. Contudo, houve uma importante redução sintomatológica durante o período de acompanhamento de acordo com o relato dos pais. Em terceiro lugar, embora nossa amostra tenha sido pequena para detectar efeitos significativos deste polimorfismo na dimensão hiperatividade-impulsividade e sobre efeitos adversos, fomos capazes de estudar uma amostra maior do que aquela de estudos farmacogenéticos prévios.<sup>25,39,40</sup> Além disso este é o primeiro estudo farmacogenético que avaliou efeitos adversos em pacientes com TDAH.

Embora seja importante estudarmos polimorfismos de nucleotídeos únicos em genes candidatos razoáveis, deve ser considerado que o seu efeito provável é certamente pequeno, mesmo que relacionado à resposta à medicação. Assim, para o crescimento deste campo da ciência, esforços entre diferentes grupos são



necessários com o objetivo de estudarmos um maior número de pacientes, como aquele atualmente em desenvolvimento através do ADHD Molecular Genetics Network. Ainda, varreduras genômicas devem incorporar a resposta à medicação como um desfecho para as suas análises.

Achados de estudos neurobiológicos e farmacológicos documentaram a importância do sistema noradrenérgico para a ação do MFD. Corroborando esta hipótese, fomos capazes de demonstrar a influência de um polimorfismo localizado no *ADRA2A* na redução dos sintomas de desatenção com o tratamento com MFD em indivíduos com TDAH. Neste sentido, outros estudos farmacogenômicos devem ser conduzidos, preferencialmente a partir de ensaios clínicos randomizados, com ampla descrição da seleção da amostra e de controle de possíveis vieses de seleção, com o objetivo de replicar nossos achados e de explorar outros genes do sistema noradrenérgico.

## REFERÊNCIAS

- (1) Swanson JM, Sergeant JA, Taylor E, Sonuga-Barke EJ, Jensen PS, Cantwell DP. Attention-deficit hyperactivity disorder and hyperkinetic disorder. *Lancet*. 1998;351(9100):429-33.
- (2) Goldman LS, Genel M, Bezman RJ, Slanetz PJ. Diagnosis and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents. Council on Scientific Affairs, American Medical Association. *JAMA*. 1998;279(14):1100-7.
- (3) Solanto MV. Neuropsychopharmacological mechanisms of stimulant drug action in attention-deficit hyperactivity disorder: a review and integration. *Behav Brain Res*. 1998;94(1):127-52.
- (4) Pliszka SR, McCracken JT, Maas JW. Catecholamines in attention-deficit hyperactivity disorder: current perspectives. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1996;35(3):264-72.
- (5) Arnsten AF, Li BM. Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biol Psychiatry*. 2005;57(11):1377-84.
- (6) Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Ding YS. Imaging the effects of methylphenidate on brain dopamine: new model on its therapeutic actions for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*. 2005;57(11):1410-5.
- (7) Arnsten AF, Steere JC, Hunt RD. The contribution of alpha 2-noradrenergic mechanisms of prefrontal cortical cognitive function. Potential significance for attention-deficit hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 1996;53(5):448-55.
- (8) Kuczenski R, Segal DS. Stimulant actions in rodents: implications for attention-deficit/hyperactivity disorder treatment and potential substance abuse. *Biol Psychiatry*. 2005;57(11):1391-6.
- (9) Andrews GD, Lavin A. Methylphenidate Increases Cortical Excitability via Activation of Alpha-2 Noradrenergic Receptors. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31(3):594-601.
- (10) Arnsten AF, Dudley AG. Methylphenidate improves prefrontal cortical cognitive function through alpha2 adrenoceptor and dopamine D1 receptor actions: Relevance to therapeutic effects in Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Behav Brain Funct*. 2005;1(1):2.
- (11) Biederman J, Spencer T, Wilens T. Evidence-based pharmacotherapy for attention-deficit hyperactivity disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2004;7(1):77-97.

- (12) Lario S, Calls J, Cases A, Oriola J, Torras A, Rivera F. MspI identifies a biallelic polymorphism in the promoter region of the alpha 2A-adrenergic receptor gene. *Clin Genet*. 1997;51(2):129-30.
- (13) Comings DE, Gade-Andavolu R, Gonzalez N, Blake H, Wu S, MacMurray JP. Additive effect of three noradrenergic genes (ADRA2a, ADRA2C, DBH) on attention-deficit hyperactivity disorder and learning disabilities in Tourette syndrome subjects. *Clin Genet*. 1999;55(3):160-72.
- (14) Xu C, Schachar R, Tannock R et al. Linkage study of the alpha2A adrenergic receptor in attention-deficit hyperactivity disorder families. *Am J Med Genet*. 2001;105(2):159-62.
- (15) Roman T, Schmitz M, Polanczyk GV, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH. Is the alpha-2A adrenergic receptor gene (ADRA2A) associated with attention-deficit/hyperactivity disorder? *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2003;120(1):116-20.
- (16) Park L, Nigg JT, Waldman ID et al. Association and linkage of alpha-2A adrenergic receptor gene polymorphisms with childhood ADHD. *Mol Psychiatry*. 2005;10(6):572-80.
- (17) Stevenson J, Langley K, Pay H et al. Attention deficit hyperactivity disorder with reading disabilities: preliminary genetic findings on the involvement of the ADRA2A gene. *J Child Psychol Psychiatry*. 2005;46(10):1081-8.
- (18) Roman T, Polanczyk GV, Zeni C, Genro JP, Rohde LA, Hutz MH. Further evidence of the involvement of alpha-2A-adrenergic receptor gene (ADRA2A) in inattentive dimensional scores of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*. 2006;11(1):8-10.
- (19) Wang B, Wang Y, Zhou R et al. Possible association of the alpha-2A adrenergic receptor gene (ADRA2A) with symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2006;141(2):130-4.
- (20) Schmitz M, Denardin D, Silva TL et al. Association of the Alfa-2A adrenergic receptor gene with ADHD inattentive type. *Biol Psychiatry*., in press.
- (21) Sergeant J. Are we ready for endophenotypes in attention deficit hyperactivity disorder? *Rev Bras Psiquiatr*. 2005;27(4):262-3.
- (22) Weinshilboum R. Inheritance and drug response. *N Engl J Med*. 2003;348(6):529-37.
- (23) Polanczyk G, Zeni C, Genro J, Roman T, Hutz MH, Rohde L A. Attention-deficit/hyperactivity disorder: advancing on pharmacogenomics. *Pharmacogenomics*. 2005;6(3):225-34.

(24) Hamarman S, Ulger C, Fossella J, Brimacombe M, Dermody J. Influence of dopamine genes on stimulant response in ADHD children. 50th Annual Meeting of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry. Miami, USA, 2003.

(25) Yang L, Wang YF, Li J, Faraone SV. Association of norepinephrine transporter gene with methylphenidate response. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2004;43(9):1154-8.

(26) American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Diseases, fourth edition (DSM-IV)*. Washington, DC: American Psychiatric Association; 1994.

(27) Barkley RA, Biederman J. Toward a broader definition of the age-of-onset criterion for attention-deficit hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1997;36(9):1204-10.

(28) Rohde LA, Biederman J, Zimmermann H, Schmitz M, Martins S, Tramontina S. Exploring ADHD age-of-onset criterion in Brazilian adolescents. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2000;9(3):212-8.

(29) Rohde LA. ADHD in Brazil: the DSM-IV criteria in a culturally different population. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2002;41(9):1131-3.

(30) Swanson JM, Kraemer HC, Hinshaw SP et al. Clinical relevance of the primary findings of the MTA: success rates based on severity of ADHD and ODD symptoms at the end of treatment. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2001;40(2):168-79.

(31) Stevens J, Quittner AL, Abikoff H. Factors influencing elementary school teachers' ratings of ADHD and ODD behaviors. *J Clin Child Psychol*. 1998;27(4):406-14.

(32) Correia Filho AG, Bodanese R, Silva TL, Alvares JP, Aman M, Rohde L A. Comparison of Risperidone and Methylphenidate for Reducing ADHD Symptoms in Children and Adolescents With Moderate Mental Retardation. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2005;44(8):748-55.

(33) Barkley RA. *Attention-Deficit Hyperactivity Disorder: A Handbook for Diagnosis and Treatment*. New York: Guilford Press;1990.

(34) Lahiri DK, Nurberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*. 1991;19:5444.

(35) Gibbons RD, Hedeker D, Elkin I et al. Some conceptual and statistical issues in analysis of longitudinal psychiatric data. Application to the NIMH treatment of Depression Collaborative Research Program dataset. *Arch Gen Psychiatry*. 1993;50(9):739-50.

- (36) Mallinckrodt CH, Clark WS, David SR. Accounting for dropout bias using mixed-effects models. *J Biopharm Stat.* 2001;11(1-2):9-21.
- (37) Gueorguieva R, Krystal JH. Move over ANOVA: progress in analyzing repeated-measures data and its reflection in papers published in the Archives of General Psychiatry. *Arch Gen Psychiatry.* 2004;61(3):310-7.
- (38) Littell RC, Pendergast J, Natarajan R. Modelling covariance structure in the analysis of repeated measures data. *Stat Med.* 2000;19(13):1793-819.
- (39) Roman T, Szobot C, Martins S, Biederman J, Rohde LA, Hutz MH. Dopamine transporter gene and response to methylphenidate in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pharmacogenetics.* 2002;12(6):497-9.
- (40) Winsberg BG, Comings DE. Association of the dopamine transporter gene (DAT1) with poor methylphenidate response. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 1999;38(12):1474-7.
- (41) Schachter HM, Pham B, King J, Langford S, Moher D. How efficacious and safe is short-acting methylphenidate for the treatment of attention-deficit disorder in children and adolescents? A meta-analysis. *CMAJ.* 2001;165(11):1475-88.
- (42) Crenshaw, T.M, Kavale KA, Forness SR, Reeve RE. Attention-Deficit Hyperactivity Disorder and the efficacy of stimulant medication: a meta-analysis. *Advances in Learning & Behavioral Disabilities.* Greenwich, CT: JAI Press;1999.
- (43) Belfer I, Buzas B, Hipp H et al. Haplotype-based analysis of alpha 2A, 2B, and 2C adrenergic receptor genes captures information on common functional loci at each gene. *J Hum Genet.* 2005;50(1):12-20.
- (44) Comings DE, Gonzalez N, Li C, MacMurray JP. 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.* 2003;118:110-4.
- (45) A 14-month randomized clinical trial of treatment strategies for attention-deficit/hyperactivity disorder. The MTA Cooperative Group. Multimodal Treatment Study of Children with ADHD. *Arch Gen Psychiatry.* 1999;56(12):1073-86.

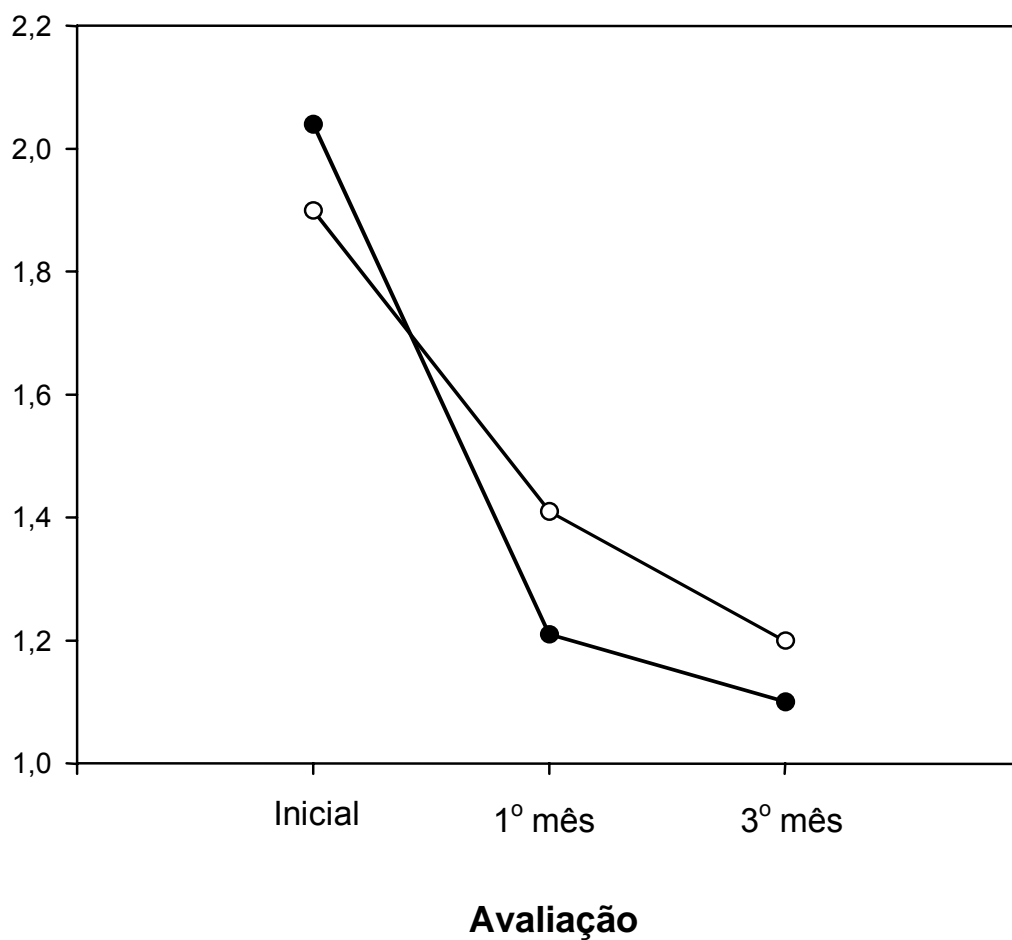
**Tabela 1. Características demográficas e clínicas da amostra de acordo com a presença do alelo G.**

	G + (genótipos G/G e G/C) n=66	G - (genótipo C/C) n=40	valor <i>P</i>
Idade - média (DP)	10.2 (2.8)	10.4 (3.5)	0.7
Meninos - n (%)	49 (74)	33 (82)	0.3
IQ - média (DP)	93.5 (15.1)	95 (15.2)	0.6
TDAH (subtipos) - n (%)			0.4
combinado	38 (58)	24 (60)	
desatento	19 (29)	9 (22.5)	
hiperativo-impulsivo	2 (3)	4 (10)	
sublimiar	7 (10)	3 (7.5)	
Transtornos comórbidos – n (%)			
TC	9 (13.6)	8 (20)	0.4
TOD	31 (47)	24 (60)	0.2
Transtornos do humor	5 (7.6)	5 (12.5)	0.5
Transtornos de ansiedade	16 (24.6)	9 (22.5)	1
CGAS - média (DP)	61.3 (10.8)	60.7 (11.5)	0.8
SNAP-IV escores basais - média (DP)			
total	1.64 (0.58)	1.66 (0.53)	0.9
desatenção	2.05 (0.5)	1.92 (0.5)	0.18
hiperatividade-impulsividade	1.57 (0.82)	1.6 (0.7)	0.8
oposição	1.3 (0.8)	1.4 (0.7)	0.4
SERS escore basal - média (DP)	34.6 (22)	34.7 (20)	0.9
Uso prévio de medicações - n (%)	4 (6)	3 (7.5)	1
Prescrição concomitante de outra medicação - n (%)	4 (6)	6 (15)	0.17
Dose MFD na avaliação inicial - média (DP)	0.48 (0.13)	0.53 (0.19)	0.19
Dose MFD no 1º mês- média (DP)	0.66 (0.2)	0.63 (0.17)	0.4

Abreviações: DP = desvio padrão; n = número absoluto; QI = coeficiente de inteligência; TDAH = transtorno de déficit de atenção/hiperatividade; TC = transtorno de conduta; TOD = transtorno oposicional desafiante; MFD = metilfenidato; CGAS = Children Global Assessment Scale; SNAP-IV = Swanson, Nolan e Pelham scale - versão IV; SERS = Barkley's Side Effect Rating Scale. Valores de *P* calculados através do Teste de  $\chi^2$  ou Teste Exato de Fisher (variáveis categóricas), e Teste *t* de Student (variáveis contínuas com distribuição normal).

**Figura 1. Escores médios de desatenção da SNAP-IV durante o tratamento com metilfenidato de acordo com a presença do alelo G.**

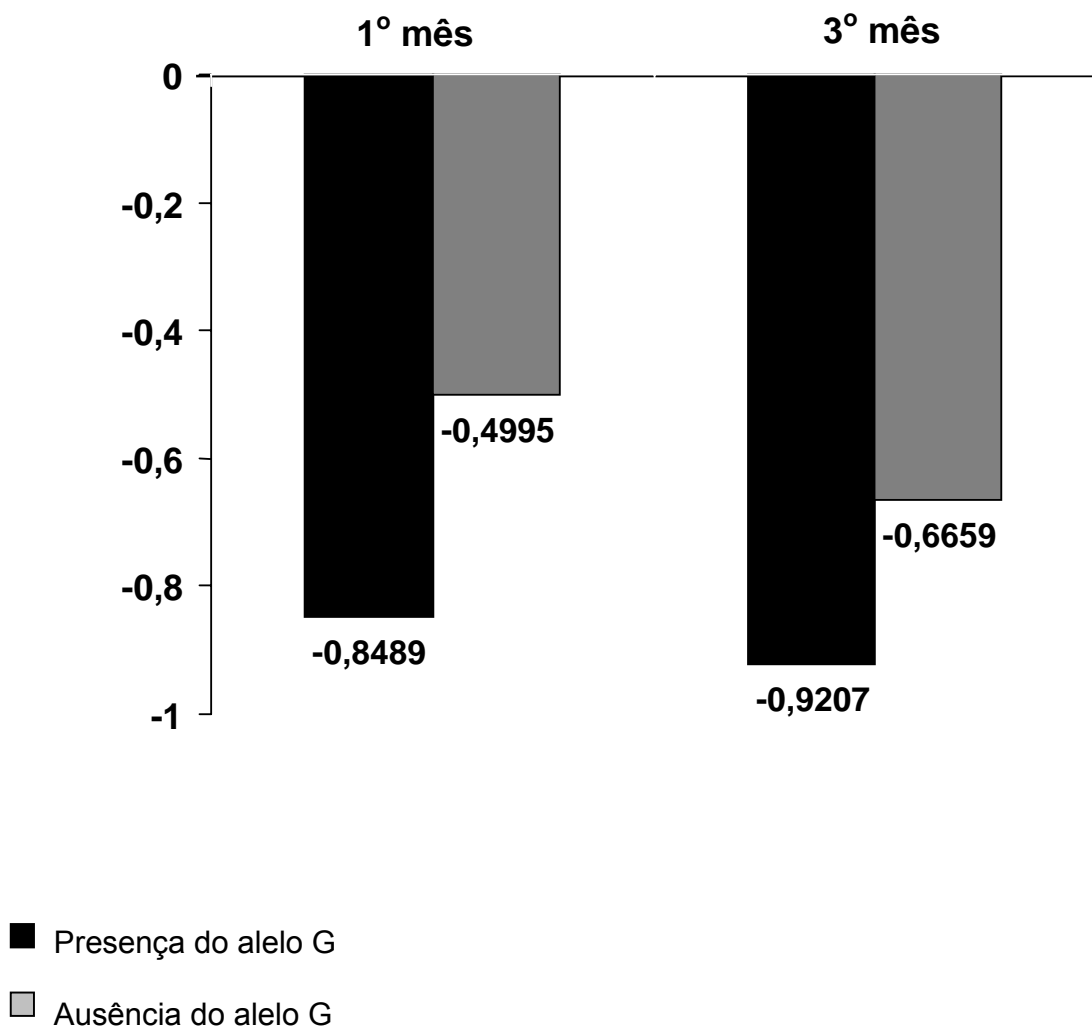
- Presença do alelo G (genótipos G/C e G/G)
- Ausência do alelo G (genótipo C/C)



Modelo de Efeitos Mistos (n=106) - tratamento ao longo do tempo:  $F_{2,198} = 79.37$ ;  
 $P < 0.001$ ; presença do alelo G:  $F_{1,118} = 0.67$ ;  $P = 0.41$ ; tratamento ao longo do  
tempo \*presença do alelo G:  $F_{2,198} = 4.30$ ;  $P = 0.015$ .



**Figura 2. Efeito do alelo G sobre escores  $\Delta$  de desatenção da SNAP-IV a partir da avaliação inicial.**



Modelo de Efeitos Mistos (n=106) – presença do alelo G:  $F_{1,101.9}=6.6$ ;  $P=0.012$ .

## 6.2 Versão em Inglês

### **Adrenergic $\alpha$ 2A receptor gene is associated with methylphenidate improvement of inattentive symptoms in children with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder**

Guilherme Polanczyk, MD; Cristian Zeni, MD; Julia P. Genro, BSc; Ana Paula Guimarães, BSc; Tatiana Roman, PhD; Mara H. Hutz, PhD; Luis Augusto Rohde, MD

**Context.** Pre-clinical studies have demonstrated the relevance of adrenergic  $\alpha$ 2A receptor on both the attentional process and the mechanism of action of methylphenidate (MPH). Several previous molecular genetic investigations suggested a role for the adrenergic  $\alpha$ 2A receptor gene (*ADRA2A*) in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD), especially in the inattentive dimension. However, the influence of *ADRA2A* in the response to MPH in humans has not been previously investigated.

**Objective.** To evaluate the association between the *ADRA2A* -1291 C>G polymorphism and clinical response to MPH in children and adolescents with ADHD.

**Design.** A pharmacogenomic study was undertaken between 2002 and 2004 using a non-random assignment, quasi-experimental design.

**Setting.** The ADHD outpatient program at a University hospital in Brazil.

**Patients.** One hundred and six patients consecutively diagnosed with ADHD were genotyped for *ADRA2A* –1291 C>G polymorphism and included in analyses.

**Intervention.** Short-acting MPH administered in increasing doses until no further clinical improvement was detected or limiting side effects occurred.

**Main Outcome Measures.** The primary outcome measure was the parent-rated inattentive subscale of the Swanson, Nolan, and Pelham scale - version IV (SNAP-IV). Secondary outcome measures included the parent-rated hyperactivity subscale of the SNAP-IV and the Barkley's Side Effect Rating Scale (SERS). Scales were applied by child psychiatrists blinded to genotype at baseline, first and third month of treatment.

**Results.** A significant effect of the interaction between the presence of the G allele and treatment with MPH over time on inattentive scores was detected during the three months of treatment ( $n=106$ ;  $F_{2,198}=4.30$ ;  $P=0.015$ ).

**Conclusions.** We documented the influence of the G allele at the *ADRA2A* –1291 C>G polymorphism on the improvement of inattentive symptoms with MPH treatment in children and adolescents with ADHD. This finding provides a clinical evidence for the involvement of noradrenergic system on the modulation of MPH action.

A preliminary version of this study was presented at the 52<sup>nd</sup> Annual Meeting of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry. Toronto, Canada; 2005.

This work was partially supported by research grants from: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) (Grant 471761/03-6), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX, Brazil), and Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

**Author Affiliations:** ADHD Outpatient Clinic, Child and Adolescent Psychiatric Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil (Drs Polanczyk, Zeni, and Rohde). Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil (Ms Genro and Guimarães, and Dr Hutz). Department of Morphological Sciences, Federal School of Medical Sciences of Porto Alegre, Brazil (Dr Roman).

**Correspondence:** Dr Luis Augusto Rohde, Serviço de Psiquiatria da Infância e Adolescência, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Zip code: 90035-003. Telephone/fax: 55 51 3321 3946. Email: lrohde@terra.com.br

**Conflict of Interest:** The ADHD Program receives research support from the following pharmaceutical companies: Bristol-Myers Squibb, Eli-Lilly, Janssen-Cilag, and Novartis. Dr Rohde is on the speakers' bureau or is a consultant for the same companies.

## INTRODUCTION

Methylphenidate (MPH) has been used for the treatment of inattention and hyperactivity for more than 50 years.<sup>1</sup> Subjects with Attention-Deficit / Hyperactivity Disorder (ADHD) have clinically significant benefits with MPH treatment both in terms of robust decrease of symptoms and improvement of quality of life.<sup>2</sup> However, its mechanisms of action are not completely understood.<sup>3</sup>

Methylphenidate's effect over dopaminergic and noradrenergic pathways results in improvement of prefrontal cortex (PFC) functions.<sup>4, 5</sup> The most studied action of MPH is its blockade of dopamine transporters (DAT) which increases levels of synaptic and extracellular dopamine (DA) contributing to the transmission of nervous impulse.<sup>3</sup> Rising DA levels, MPH might enhance the saliency of events.<sup>6</sup> The action of MPH on the noradrenergic system has received much less attention. It was demonstrated that the activation of this system modulating attentional processes improves PFC function in humans and animals.<sup>3-5, 7</sup> MPH blocks norepinephrine (NE) transporters<sup>3</sup> and low, oral doses of this medication have more effect on NE than on DA in subcortical areas.<sup>8</sup> Adrenergic  $\alpha$ 2A receptor is a key component of the noradrenergic system<sup>7</sup> with a putative role on MPH action demonstrated in studies with animal models.<sup>9, 10</sup> Moreover, adrenergic  $\alpha$ 2A receptor agonists, such as guanfacine and clonidine, are efficacious in the treatment of ADHD.<sup>11</sup>

The adrenergic  $\alpha$ 2A receptor gene (*ADRA2A*) is located in chromosome 10q24-26. A -1291 C>G single nucleotide polymorphism (SNP) (rs 1800544) creating a *MspI* site in the promoter region of the gene has been identified by Lario

et al.<sup>12</sup> Six out of eight studies which have evaluated the association between *ADRA2A* and ADHD suggested a role for this polymorphism in the susceptibility for the disorder.<sup>13-20</sup> A specific role for the *ADRA2A* –1291 C>G polymorphism in the dimension of inattention has been demonstrated in several of these investigations.<sup>15, 18, 20</sup>

Pharmacogenetic studies aim to identify genes associated with variations in efficacy and side effects secondary to a medication regimen.<sup>21, 22</sup> The majority of ADHD pharmacogenetic studies have focused on potential genes of susceptibility for ADHD, mainly from the DA system.<sup>23</sup> Only two studies have evaluated noradrenergic genes,<sup>24, 25</sup> but none have studied the influence of *ADRA2A* on MPH treatment outcomes.

The primary aim of this study was to evaluate the association between *ADRA2A* –1291 C>G polymorphism and clinical improvement of inattentive symptoms with MPH treatment in children and adolescents with ADHD. In secondary exploratory analyses, it was evaluated the effect of this polymorphism in both improvement of hyperactive-impulsive symptoms and occurrence of main side events with MPH use.

## **METHODS**

### **Study design**

This is a pharmacogenomic study using a non-random assignment, quasi-experimental design.

### **Subjects**

Children and adolescents consecutively evaluated during two years in the ADHD Outpatient Program at the Hospital de Clinicas de Porto Alegre for whom data on response to MPH for at least the first month of treatment was available were invited to join the study. This investigation was approved by the Ethical Committee of our University Hospital. Written informed consent was obtained from parents and verbal assent was requested from children and adolescents to participate.

The inclusion criteria were: a) ADHD diagnosis according to DSM-IV criteria;<sup>26</sup> b) age between 4 and 17 years-old; c) European-Brazilian ethnicity; d) drug naïve for MPH; e) prescribed dose of MPH  $\geq$  0.3 mg/kg/day. Subjects who fulfilled all DSM-IV criteria for ADHD except age-of-onset of impairment criterion (symptoms causing impairment before 7 years of age) were accepted in this study since recent research do not support the validity of this criteria.<sup>27, 28</sup>

### **Diagnostic procedures and clinical assessments**

The diagnostic procedures in our unit were extensively described elsewhere.<sup>29</sup> In short, diagnoses of ADHD and comorbidities were achieved

through a three stage process: 1) semi-structured interviews (Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children - Epidemiologic version [K-SADS-E]), 2) diagnostic discussion in a clinical committee, and 3) clinical evaluation. When a diagnostic disagreement occurred in the three-stage process, priority is given to diagnoses derived from clinical interviews.<sup>29</sup> Clinical assessments were performed by child psychiatrists at baseline, 30 and 90 days of treatment with MPH.

Based on previous investigations in our population showing an association between *ADRA2A* and inattentive scores,<sup>15, 18</sup> we selected the parent-rated inattentive subscale of the Swanson, Nolan, and Pelham scale - version IV (SNAP-IV) as the primary outcome measure. The SNAP-IV scale is a revision of the Swanson, Nolan and Pelham (SNAP) Questionnaire.<sup>30</sup> The SNAP-IV items are rated on a scale from 0 to 3. This measure has been frequently used in ADHD investigations, including those designed to assess clinical interventions.<sup>30</sup> The internal consistency of the SNAP-IV varies from good to excellent.<sup>31</sup> In a previous study, we obtained a Cronbach's alpha coefficient of 0.74 for the complete scale (26 items) in a different sample.<sup>32</sup> The scale was applied by child psychiatrists to parents.

Secondary outcome measures included the parent-rated hyperactivity-impulsivity subscale of the SNAP-IV and the Barkley's Side Effect Rating Scale (SERS). The SERS lists 17 side effects associated with stimulants use. The severity of each symptom is scored from 0 to 9.<sup>33</sup>

## **Pharmacological Intervention**



Patients were treated according to the program's protocol. Doses of short-acting MPH were augmented until no further clinical improvement was detected or there were limiting side effects.<sup>29</sup> MPH was administered preferentially twice daily (8 AM and noon), but an extra dose at 5-6 PM was allowed for children needing continuous coverage during evenings. Psychiatrists were blind to patients' genotypes. Mean dose of MPH prescribed at baseline and first month assessments were 0.5 and 0.65 mg/kg/day, respectively.

### **Genotyping**

High molecular weight genomic DNA was extracted from whole blood lymphocytes by a salting out procedure.<sup>34</sup> The -1291 C>G polymorphism in the promoter region of *ADRA2A* (rs 1800544) was amplified by the polymerase chain reaction (PCR) using the primers and protocols as previously reported.<sup>12</sup> The 522 bp amplicons were digested with *MspI* for 3 hr at 37°C. The digested fragments were electrophoresed on 10% polyacrylamide gels, in 1x TBE buffer for 2.5-3 hr at 160 V. The gels were stained with ethidium bromide and visualized under ultraviolet light. *MspI* digestion at this site resulted in four constant fragments (5, 62, 116, and 165 bp). Allele C (former M) is identified as a polymorphic band of 174 bp reflecting the absence of the *MspI* site. The presence of this site produces the loss of the 174 bp fragment resulting in bands of 121 and 53 bp that determined the allele "G" (former m).<sup>12</sup>

### **Data analyses**

Patients were compared regarding demographic characteristics, IQ, ADHD subtype, comorbid conditions, previous use of medication, baseline scores in measures assessed, and MPH dose using the  $\chi^2$  test or Fisher's Exact Test (categorical variables), and the Student *t* test (continuous variables with normal distribution).

Analyses of primary and secondary measures of efficacy were performed using a Mixed-Effects Model (MEM) approach which provides a flexible framework for the analysis of repeated measures while accounting for missing data (ie, lost of follow-up).<sup>35-37</sup> For each analysis, the best covariance structure fitting the data was selected based on the one with the lowest Akaike's information criterion (AIC) value.<sup>38</sup> Independent factors included in all models were: treatment over time, group assignment (defined as the presence of the G allele), and the interaction between these factors. Potential confounders to be entered in models were defined based on conceptual analyses of the literature and using a statistical definition (association with both the study factor and outcome for a  $P \leq 0.10$ ). We restricted analyses on SNAP-IV dimensions to patients presenting baseline scores higher than 1 in the SNAP-IV subscales to allow sufficient room for improvement as have been done in previous investigations.<sup>39, 40</sup>

All analyses were conducted using SPSS version 12.0. A significance level of 5% was accepted in all analyses (except for confounders, see above). Tests were two-tailed.

## RESULTS

During the study period, 111 families took part of the study and their affected children fulfilled inclusion criteria for analyses of the primary outcome measure (SNAP-IV inattentive score). Five subjects were not included in analyses due to invalid baseline data (n=2), irregular use of MPH (n=2) and problems in genotyping (n=1). Thus, 106 patients were included in the study (data for baseline and 1 month of treatment were available for all of them). After 90 days of treatment, 89 were re-evaluated. An additional sample of 26 other patients was assessed only at baseline and they were not included in this protocol (eleven subjects were referred after baseline evaluation since they lived in different cities of our state. Fifteen patients did not return for the one-month evaluation). Regarding baseline characteristics, no significant difference between subjects included (n=106) and not included (n=5+26=31) was detected on age, gender, IQ, ADHD subtype, comorbidity profile (anxiety disorders, mood disorders, disruptive behavior disorders), global functioning scores, baseline total scores in the SNAP-IV scale (parent and teacher scores), and prescribed dose of MPH ( $P>0.1$  for all analyses). In addition, the 106 subjects included in this protocol did not differ in the above-mentioned baseline characteristics from all subjects evaluated in our Unit from October 2002 to February 2006 (n=457).

The allele frequencies for the included subjects were estimated as 0.62 for the C allele and 0.38 for the G allele. The genotype frequencies were 0.38 for C/C homozygous, 0.49 for heterozygotes G/C, and 0.13 for G/G homozygous. These frequencies were under Hardy-Weinberg equilibrium. Due to the low frequency of

G/G homozygous individuals, they were grouped with those carriers of a G/C genotype. Therefore carriers of the G allele were compared to those without this allele (homozygous subjects for the C allele) in order to explore the effect of the presence of the G allele over outcomes.

Demographic and clinical characteristics of patients according to the presence of the G allele are presented in Table 1. No significant difference was found on potential confounders (demographic characteristics, IQ, ADHD subtype, comorbid conditions, previous use of medication, baseline scores in measures assessed, and MPH doses) between the two groups. In addition, no potential confounder was associated with both the presence of the G allele and inattentive scores in the SNAP-IV for a  $P \leq 0.10$ .

In the model including treatment over time, presence of the G allele, and the interaction between these factors, an effect of the treatment over time was found for the SNAP-IV inattentive scores during the three months of treatment ( $n=106$ ;  $F_{2,198} = 79.37$ ;  $P < 0.001$ ). Although no effect for the presence of the G allele was detected ( $n=106$ ;  $F_{1,118} = 0.67$ ;  $P = 0.41$ ), there was a significant effect of the interaction between the presence of G allele and treatment over time for the SNAP-IV inattentive scores during the three months of treatment ( $n=106$ ;  $F_{2,198} = 4.30$ ;  $P = 0.015$ ) (Figure 1). The covariance structure with the lowest AIC value was the 1<sup>st</sup> order Auto-regressive. In a secondary analysis, we estimated that this model was able to explain 30.43% of the variance of inattentive scores; 0.24% was explained by the G allele, 28.85% by time and 1.34% by the interaction between the allele and time.

Data presented in Figure 1 clearly suggest that the greatest effect of treatment occurred from baseline to the first month in both groups, as expected. In fact, the improvement from the baseline to the first month of treatment ( $n=106$ ; Effect Size=1.15) was greater than improvement from the first to the third month of treatment ( $n=89$ ; Effect Size=0.20). Thus, the effects of treatment over time, G allele, and treatment over time X G allele during only the first month of treatment were also assessed through MEM. The covariance structure with the lowest AIC value was the Compound Symmetry. As expected, a significant effect of the treatment with MPH over time ( $n=106$ ;  $F_{1,104} = 126.69$ ;  $P < 0.001$ ) and of the interaction between the presence of G allele and MPH treatment over time on the SNAP-IV inattentive scores ( $n=106$ ;  $F_{1,104} = 8.51$ ;  $P = 0.004$ ) were detected. No effect of the presence of G allele was found ( $n=106$ ;  $F_{1,104} = 0.22$ ;  $P = 0.64$ ).

We explored the effect of the treatment over time, presence of the G allele, and the interaction between both on SNAP-IV inattentive scores from the first to the third month of treatment using baseline inattentive score as a covariate through MEM. This procedure was done since a small between-groups difference in baseline inattentive scores in the SNAP-IV was detected (although higher than our threshold of  $P < 0.1$ ). In this MEM analysis, the covariance structure with the lowest AIC value was the Compound Symmetry. Effects of the treatment over time ( $n=106$ ;  $F_{1,96.9} = 3.81$ ;  $P = 0.05$ ), baseline inattentive scores ( $n=106$ ;  $F_{1,104} = 14.82$ ;  $P < 0.001$ ), and the presence of the G allele ( $n=106$ ;  $F_{1,104} = 5.46$ ;  $P = 0.02$ ) were found for the SNAP-IV inattentive scores. As expected, no effect was detected for the interaction between the presence of the G allele and time ( $n=106$ ;  $F_{1,96.9} = 0.61$ ;

$P=0.44$ ), since the greatest improvement occurred from baseline to the first month of treatment.

The effect of G allele over the  $\Delta$  inattentive scores from baseline to 1 and 3 months was simultaneously analyzed through MEM. The covariance structure with the lowest AIC value was the Toeplitz. This analysis also demonstrated a significant effect of the G allele over  $\Delta$  scores ( $n=106$ ;  $F_{1,101.9} = 6.6$ ;  $P=0.012$ ). Individuals with the G allele achieved greater reduction of inattentive scores than individuals without this allele from baseline to the first month and third month of treatment (see Figure 2).

As expected, an effect of the treatment over time was found for the SNAP-IV hyperactive-impulsive scores during the three months of treatment ( $n=83$ ;  $F_{2,155.6} = 62.1$ ;  $P<0.001$ ). However, there was no effect of the interaction between the presence of the G allele and treatment over the SNAP-IV hyperactivity-impulsivity scale ( $n=83$ ;  $F_{2,155.6} = 0.61$ ;  $P=0.54$ ). In addition, no effect of the presence of G allele was detected ( $n=83$ ;  $F_{1,81.3} = 0.05$ ;  $P=0.82$ ). The covariance structure with the lowest AIC was Compound Symmetry.

Regarding adverse events, MEM analysis demonstrated an effect of treatment over time over SERS scores, as expected ( $n=106$ ;  $F_{2,201.2} = 5.4$ ;  $P=0.005$ ). However, neither an effect for the presence of G allele ( $n=106$ ;  $F_{1,107.6} = 0.15$ ;  $P=0.69$ ) nor an effect for the interaction between the presence of the G allele and treatment over time ( $n=106$ ;  $F_{2,201.2} = 0.71$ ;  $P=0.49$ ) on SERS scores were found during the three months of MPH use. The covariance structure with the lowest AIC value was the 1<sup>st</sup> order Auto-regressive)

## DISCUSSION

As previously reported by a number of clinical trials,<sup>41, 42</sup> we have detected a significantly robust clinical effect of MPH in ADHD symptoms during a short-term treatment. Furthermore, we have demonstrated a greater improvement of inattentive symptoms with MPH treatment already in the first month of treatment in those children and adolescents with the G allele (G/G and G/C genotypes) at *ADRA2A* –1291 C>G polymorphism compared with those without this allele. We are not aware of previous studies investigating the role of the *ADRA2A* in the response to MPH.

This finding concurs with recent pre-clinical studies in animals which provides evidences for the contribution of the blockade of adrenergic  $\alpha$ 2A receptor in both producing ADHD-like symptoms and impairing response to MPH. Arnsten and Dudley<sup>10</sup> studied the effect of MPH on rats performing a delayed alternation task (an attentional task). The authors demonstrated that MPH significantly improved the performance on the task. Subsequently, MPH and an adrenergic  $\alpha$ 2A receptor antagonist (idazoxan) were co-administered. The enhancing effect of MPH was blocked by the antagonist indicating the contribution of this receptor to positive cognitive effects of MPH.

In the same direction of our findings, previous molecular genetic investigations have suggested a role for this polymorphism at *ADRA2A* and ADHD. In our first study, we found an association between the G/G genotype at *ADRA2A* gene and inattentive scores in a sample of 92 subjects with ADHD.<sup>15</sup> In a subsequent independent sample of children with the disorder, the association

between inattentive symptoms and the G/G genotype was again detected.<sup>18</sup> Similar findings were also obtained by Park et al.<sup>16</sup> These authors investigated a possible role of *ADRA2A* gene in ADHD assessing three different SNPs, including the –1291 C>G SNP. A significant effect of this polymorphism was detected through Quantitative TDT (QTDT) in both inattentive and hyperactive-impulsive symptom dimensions, particularly through the G allele. Moreover, haplotype analyses showed significant effects of this polymorphism by either TDT or QTDT. In both cases, the G allele of –1291 C>G SNP seemed to contribute to an increased risk, especially when inattentive symptoms were considered.

These previous findings and those from this study seem to suggest that *ADRA2A* gene might be independently associated with both the ADHD phenotype (inattentive dimension) and the response to MPH in inattentive scores.

Thus, it is fundamental to understand the potential functional significance of the *ADRA2A* –1291 C>G polymorphism. Belfer et al.<sup>43</sup> recently reported that a single haplotype block spanned *ADRA2A* gene. This haplotype block is composed by 9 different SNPs that are mapped from 5' end to 3' end of *ADRA2A* locus, including the –1291 C>G and a nonsynonymous aminoacid change in position 251, known to be of functional relevance for alpha-2A-adrenoreceptor. As noted by the authors, this *ADRA2A* haplotype block was sufficient to capture the information content even when the only known functional locus was not included. In other words, the –1291 C>G polymorphism can have a role itself on *ADRA2A* expression and/or function or it can be a marker associated with another locus with a functional role. These hypotheses must be further explored.



We have demonstrated the positive effect of the presence of G allele at the *ADRA2A* –1291 C>G polymorphism in promoting a greater reduction of inattentive symptoms during MPH treatment. Comings et al.<sup>44</sup> documented a codominant effect of G allele (G/G > G/C > C/C) in a group of ADHD and ODD symptoms. Thus it is possible to speculate whether the presence of two G alleles (homozygosity) would confer an additional effect over the reduction of inattentive symptoms. We did not detect additional effects in preliminary analyses [mean reductions of inattentive symptoms according to the genotype from baseline to one and to three months of treatment were respectively: G/G= 0.69 (SE=0.14) and 0.80 (SE=0.22); G/C=0.89 (SE=0.08) and 0.93 (0.08); C/C=0.49 (SE=0.9) and 0.67 (SE=0.09)]. Thus, it is also possible that once a threshold for action has been achieved with the presence of one allele, a second allele would not be of relevance, therefore compatible with a dominant model. Nevertheless, the reduced number of subjects with G/G genotype in this sample (n=14) limits this analysis. Studies on the functional significance of –1291 C>G polymorphism are necessary to clarify the nature of its potential effect.

It is important to consider possible caveats of naturalistic studies. First, we did not have a placebo arm in this trial, so we did not have an internal control to correct for any effect of time (e.g., regression to the mean) or expectancy bias. The improvement of ADHD symptoms in our sample was comparable to those previously reported in randomized clinical trials.<sup>45</sup> Although a placebo response was likely present to some degree in our study and most likely decreased power by reducing precision of measurement of drug response, it is unlikely that placebo response has been systematically related to the polymorphism assessed. In

addition, we minimized the chance that the higher reduction in inattentive scores with MPH detected in carriers of the G allele might be attributed to other events, since we performed an extensive assessment of potential confounders between groups, a strategy which was not usually performed by previous pharmacogenomic studies of ADHD. Second, MPH was administered with no control of adherence by investigators. Although we were able to identify two patients with irregular use of the medication, we cannot rule out that lack of adherence occurred in some extent in the remaining sample. Nevertheless, there was an important overall symptomatic reduction according to parents during follow-up. Third, although our sample might have been small to detect significant effects of this polymorphism in hyperactive-impulsive dimension and side events, we were able to include a larger sample size than those from previous studies.<sup>25, 39, 40</sup> Additionally, this is the first ADHD pharmacogenomic study addressing adverse events.

Although it is important to study single nucleotide polymorphisms in reasonable candidate genes, it should be considered that their putative effects are certainly small even if they were related to response to medication in ADHD. Thus, the field strongly needs multi-site collaborative efforts to obtain larger samples, as the one currently in development through the ADHD Molecular Genetics Network. In addition, genome scan studies should incorporate response to medication in their analyses.

Findings from neurobiological and pharmacological studies documented the importance of the noradrenergic system for methylphenidate's action. Corroborating this hypothesis, we were able to demonstrate the role of a polymorphism at *ADRA2A* in the reduction of inattentive scores associated with

MPH use in subjects with ADHD. In this regard, further pharmacogenomic randomized controlled trials with both full descriptions of sample ascertainment and control for possible selection bias must be conducted to replicate our results and to address different genes from the noradrenergic system.

## REFERENCES

- (1) Swanson JM, Sergeant JA, Taylor E, Sonuga-Barke EJ, Jensen PS, Cantwell DP. Attention-deficit hyperactivity disorder and hyperkinetic disorder. *Lancet*. 1998;351(9100):429-33.
- (2) Goldman LS, Genel M, Bezman RJ, Slanetz PJ. Diagnosis and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents. Council on Scientific Affairs, American Medical Association. *JAMA*. 1998;279(14):1100-7.
- (3) Solanto MV. Neuropsychopharmacological mechanisms of stimulant drug action in attention-deficit hyperactivity disorder: a review and integration. *Behav Brain Res*. 1998;94(1):127-52.
- (4) Pliszka SR, McCracken JT, Maas JW. Catecholamines in attention-deficit hyperactivity disorder: current perspectives. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1996;35(3):264-72.
- (5) Arnsten AF, Li BM. Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biol Psychiatry*. 2005;57(11):1377-84.
- (6) Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Ding YS. Imaging the effects of methylphenidate on brain dopamine: new model on its therapeutic actions for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*. 2005;57(11):1410-5.
- (7) Arnsten AF, Steere JC, Hunt RD. The contribution of alpha 2-noradrenergic mechanisms of prefrontal cortical cognitive function. Potential significance for attention-deficit hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 1996;53(5):448-55.
- (8) Kuczenski R, Segal DS. Stimulant actions in rodents: implications for attention-deficit/hyperactivity disorder treatment and potential substance abuse. *Biol Psychiatry*. 2005;57(11):1391-6.
- (9) Andrews GD, Lavin A. Methylphenidate Increases Cortical Excitability via Activation of Alpha-2 Noradrenergic Receptors. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31(3):594-601.
- (10) Arnsten AF, Dudley AG. Methylphenidate improves prefrontal cortical cognitive function through alpha2 adrenoceptor and dopamine D1 receptor actions: Relevance to therapeutic effects in Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Behav Brain Funct*. 2005;1(1):2.
- (11) Biederman J, Spencer T, Wilens T. Evidence-based pharmacotherapy for attention-deficit hyperactivity disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2004;7(1):77-97.

- (12) Lario S, Calls J, Cases A, Oriola J, Torras A, Rivera F. MspI identifies a biallelic polymorphism in the promoter region of the alpha 2A-adrenergic receptor gene. *Clin Genet*. 1997;51(2):129-30.
- (13) Comings DE, Gade-Andavolu R, Gonzalez N, Blake H, Wu S, MacMurray JP. Additive effect of three noradrenergic genes (ADRA2a, ADRA2C, DBH) on attention-deficit hyperactivity disorder and learning disabilities in Tourette syndrome subjects. *Clin Genet*. 1999;55(3):160-72.
- (14) Xu C, Schachar R, Tannock R et al. Linkage study of the alpha2A adrenergic receptor in attention-deficit hyperactivity disorder families. *Am J Med Genet*. 2001;105(2):159-62.
- (15) Roman T, Schmitz M, Polanczyk GV, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH. Is the alpha-2A adrenergic receptor gene (ADRA2A) associated with attention-deficit/hyperactivity disorder? *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2003;120(1):116-20.
- (16) Park L, Nigg JT, Waldman ID et al. Association and linkage of alpha-2A adrenergic receptor gene polymorphisms with childhood ADHD. *Mol Psychiatry*. 2005;10(6):572-80.
- (17) Stevenson J, Langley K, Pay H et al. Attention deficit hyperactivity disorder with reading disabilities: preliminary genetic findings on the involvement of the ADRA2A gene. *J Child Psychol Psychiatry*. 2005;46(10):1081-8.
- (18) Roman T, Polanczyk GV, Zeni C, Genro JP, Rohde LA, Hutz MH. Further evidence of the involvement of alpha-2A-adrenergic receptor gene (ADRA2A) in inattentive dimensional scores of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*. 2006;11(1):8-10.
- (19) Wang B, Wang Y, Zhou R et al. Possible association of the alpha-2A adrenergic receptor gene (ADRA2A) with symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2006;141(2):130-4.
- (20) Schmitz M, Denardin D, Silva TL et al. Association of the Alfa-2A adrenergic receptor gene with ADHD inattentive type. *Biol Psychiatry*., in press.
- (21) Sergeant J. Are we ready for endophenotypes in attention deficit hyperactivity disorder? *Rev Bras Psiquiatr*. 2005;27(4):262-3.
- (22) Weinshilboum R. Inheritance and drug response. *N Engl J Med*. 2003;348(6):529-37.
- (23) Polanczyk G, Zeni C, Genro J, Roman T, Hutz MH, Rohde L A. Attention-deficit/hyperactivity disorder: advancing on pharmacogenomics. *Pharmacogenomics*. 2005;6(3):225-34.

(24) Hamarman S, Ulger C, Fossella J, Brimacombe M, Dermody J. Influence of dopamine genes on stimulant response in ADHD children. 50th Annual Meeting of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry. Miami, USA, 2003.

(25) Yang L, Wang YF, Li J, Faraone SV. Association of norepinephrine transporter gene with methylphenidate response. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2004;43(9):1154-8.

(26) American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Diseases, fourth edition (DSM-IV)*. Washington, DC: American Psychiatric Association; 1994.

(27) Barkley RA, Biederman J. Toward a broader definition of the age-of-onset criterion for attention-deficit hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1997;36(9):1204-10.

(28) Rohde LA, Biederman J, Zimmermann H, Schmitz M, Martins S, Tramontina S. Exploring ADHD age-of-onset criterion in Brazilian adolescents. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2000;9(3):212-8.

(29) Rohde LA. ADHD in Brazil: the DSM-IV criteria in a culturally different population. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2002;41(9):1131-3.

(30) Swanson JM, Kraemer HC, Hinshaw SP et al. Clinical relevance of the primary findings of the MTA: success rates based on severity of ADHD and ODD symptoms at the end of treatment. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2001;40(2):168-79.

(31) Stevens J, Quittner AL, Abikoff H. Factors influencing elementary school teachers' ratings of ADHD and ODD behaviors. *J Clin Child Psychol*. 1998;27(4):406-14.

(32) Correia Filho AG, Bodanese R, Silva TL, Alvares JP, Aman M, Rohde L A. Comparison of Risperidone and Methylphenidate for Reducing ADHD Symptoms in Children and Adolescents With Moderate Mental Retardation. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2005;44(8):748-55.

(33) Barkley RA. *Attention-Deficit Hyperactivity Disorder: A Handbook for Diagnosis and Treatment*. New York: Guilford Press;1990.

(34) Lahiri DK, Nurberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*. 1991;19:5444.

(35) Gibbons RD, Hedeker D, Elkin I et al. Some conceptual and statistical issues in analysis of longitudinal psychiatric data. Application to the NIMH treatment of Depression Collaborative Research Program dataset. *Arch Gen Psychiatry*. 1993;50(9):739-50.

- (36) Mallinckrodt CH, Clark WS, David SR. Accounting for dropout bias using mixed-effects models. *J Biopharm Stat.* 2001;11(1-2):9-21.
- (37) Gueorguieva R, Krystal JH. Move over ANOVA: progress in analyzing repeated-measures data and its reflection in papers published in the Archives of General Psychiatry. *Arch Gen Psychiatry.* 2004;61(3):310-7.
- (38) Littell RC, Pendergast J, Natarajan R. Modelling covariance structure in the analysis of repeated measures data. *Stat Med.* 2000;19(13):1793-819.
- (39) Roman T, Szobot C, Martins S, Biederman J, Rohde LA, Hutz MH. Dopamine transporter gene and response to methylphenidate in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pharmacogenetics.* 2002;12(6):497-9.
- (40) Winsberg BG, Comings DE. Association of the dopamine transporter gene (DAT1) with poor methylphenidate response. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 1999;38(12):1474-7.
- (41) Schachter HM, Pham B, King J, Langford S, Moher D. How efficacious and safe is short-acting methylphenidate for the treatment of attention-deficit disorder in children and adolescents? A meta-analysis. *CMAJ.* 2001;165(11):1475-88.
- (42) Crenshaw, T.M, Kavale KA, Forness SR, Reeve RE. Attention-Deficit Hyperactivity Disorder and the efficacy of stimulant medication: a meta-analysis. *Advances in Learning & Behavioral Disabilities.* Greenwich, CT: JAI Press;1999.
- (43) Belfer I, Buzas B, Hipp H et al. Haplotype-based analysis of alpha 2A, 2B, and 2C adrenergic receptor genes captures information on common functional loci at each gene. *J Hum Genet.* 2005;50(1):12-20.
- (44) Comings DE, Gonzalez N, Li C, MacMurray JP. 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.* 2003;118:110-4.
- (45) A 14-month randomized clinical trial of treatment strategies for attention-deficit/hyperactivity disorder. The MTA Cooperative Group. Multimodal Treatment Study of Children with ADHD. *Arch Gen Psychiatry.* 1999;56(12):1073-86.

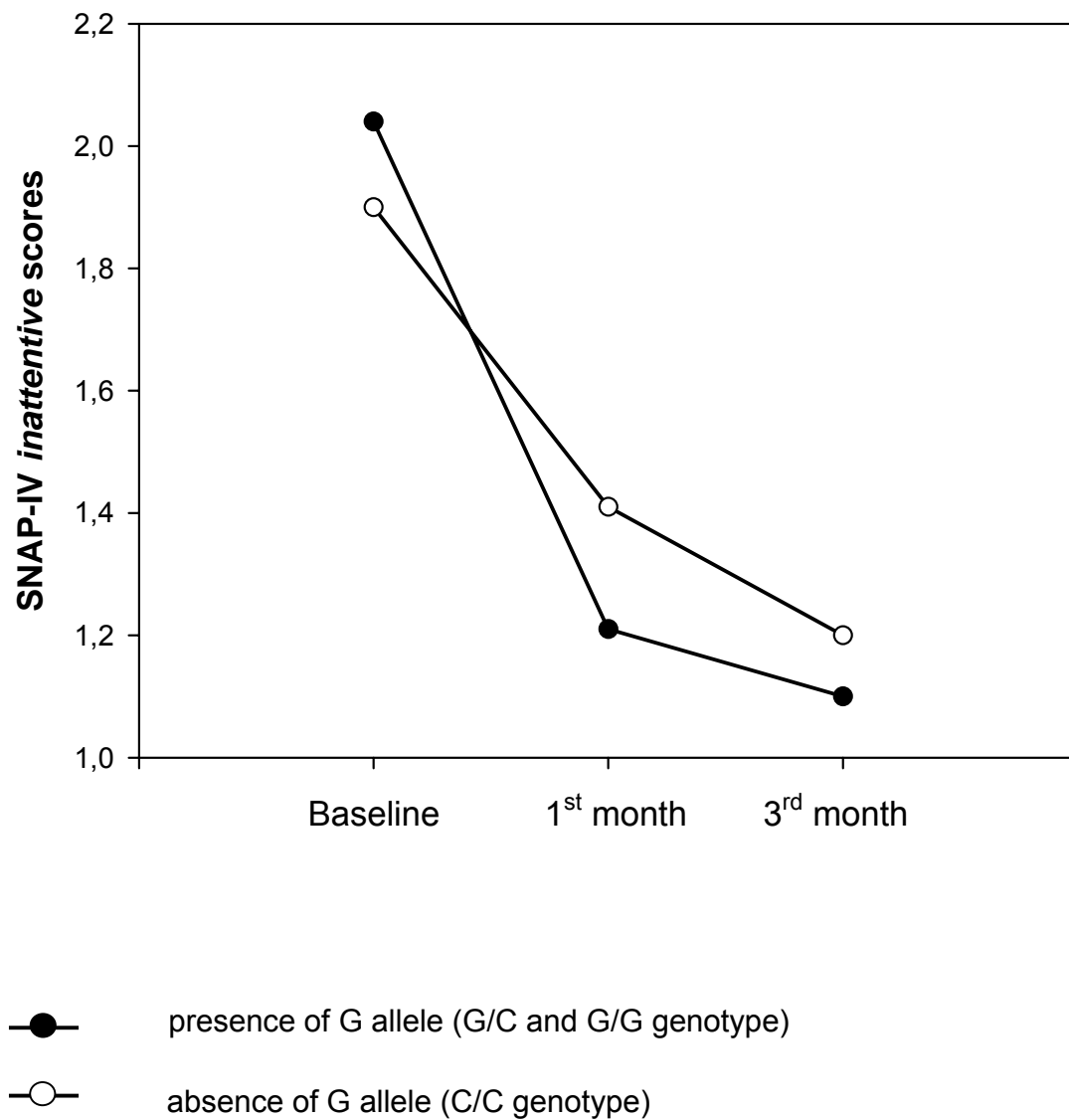
**Table 1. Demographic and clinical characteristics of the sample according to the presence of G allele.**

	G + (G/G and G/C genotypes) n=66	G - (C/C genotype) n=40	P value
Age - mean (SD)	10.2 (2.8)	10.4 (3.5)	0.7
Male gender - n (%)	49 (74)	33 (82)	0.3
IQ - mean (SD)	93.5 (15.1)	95 (15.2)	0.6
ADHD subtype - n (%)			0.4
combined	38 (58)	24 (60)	
inattentive	19 (29)	9 (22.5)	
hyperactive	2 (3)	4 (10)	
sub threshold	7 (10)	3 (7.5)	
Comorbid disorders – n (%)			
CD	9 (13.6)	8 (20)	0.4
ODD	31 (47)	24 (60)	0.2
Mood disorders	5 (7.6)	5 (12.5)	0.5
Anxiety disorders	16 (24.6)	9 (22.5)	1
CGAS baseline scores - mean (SD)	61.3 (10.8)	60.7 (11.5)	0.8
SNAP-IV baseline scores - mean (SD)			
total	1.64 (0.58)	1.66 (0.53)	0.9
inattentive	2.05 (0.5)	1.92 (0.5)	0.18
hyperactivity-impulsivity	1.57 (0.82)	1.6 (0.7)	0.8
oppositional	1.3 (0.8)	1.4 (0.7)	0.4
SERS baseline score - mean (SD)	34.6 (22)	34.7 (20)	0.9
Previous use of medication - n (%)	4 (6)	3 (7.5)	1
Concomitant prescription of another medication - n (%)	4 (6)	6 (15)	0.17
MPH doses prescribed at baseline - mean (SD)	0.48 (0.13)	0.53 (0.19)	0.19
MPH doses prescribed at first month - mean (SD)	0.66 (0.2)	0.63 (0.17)	0.4

Abbreviations: SD, standard deviation; n, absolute number; IQ, intelligence coefficient; ADHD, attention/deficit-hyperactivity disorder; CD, conduct disorder; ODD, oppositional defiant disorder; CGAS, Children Global Assessment Scale; SNAP-IV, Swanson, Nolan, and Pelham scale - version IV; SERS, Barkley's Side Effect Rating Scale; MPH, methylphenidate. *P* values were calculated by  $\chi^2$  test or Fisher's Exact Test (categorical variables), and the Student *t* test (continuous variables with normal distribution).

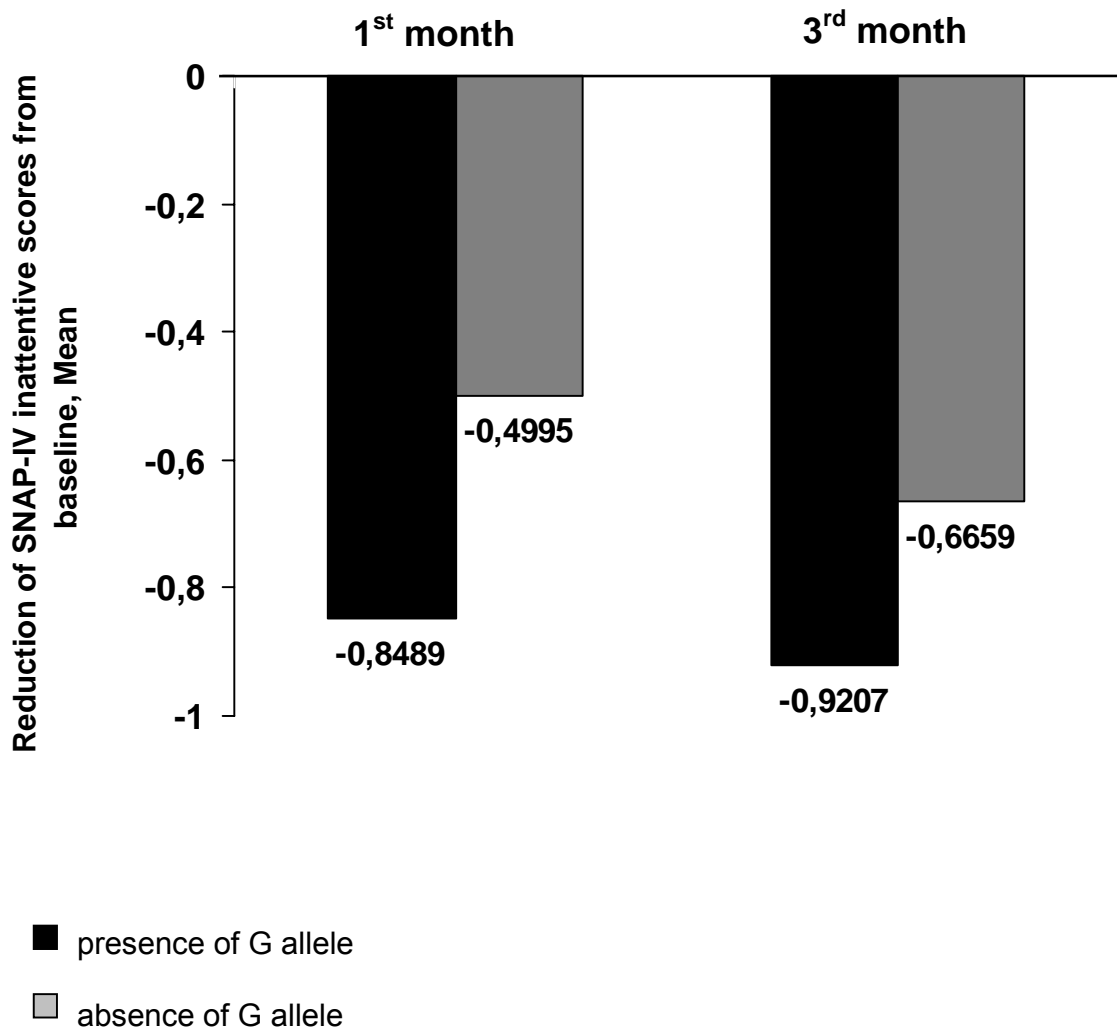


**Figure 1. Mean SNAP-IV inattentive scores during methylphenidate treatment according to the presence of G allele.**



Mixed Effect Model (n=106) - treatment over time:  $F_{2,198} = 79.37$ ;  $P < 0.001$ ;  
presence of G allele:  $F_{1,118} = 0.67$ ;  $P = 0.41$ ; treatment over time \*presence of G  
allele:  $F_{2,198} = 4.30$ ;  $P = 0.015$ .

Figure 2. Effect of the G allele over  $\Delta$  SNAP-IV inattentive scores from baseline.



Mixed-Effects Model (n=106) - presence of G allele:  $F_{1,101.9}=6.6$ ;  $P=0.012$ .

## 7 ARTIGO 2

### **Genes *DBH* e *NET1* e resposta ao tratamento com metilfenidato em crianças e adolescentes com TDAH**

Guilherme Polanczyk<sup>1</sup>; Cristian Zeni<sup>1</sup>; Julia P. Genro<sup>2</sup>; Ana Paula Guimarães<sup>2</sup>; Tatiana Roman<sup>3</sup>; Mara H. Hutz<sup>2</sup>; Luis Augusto Rohde<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Déficit de Atenção/Hiperatividade (PRODAH), Serviço de Psiquiatria da Infância e Adolescência, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. <sup>3</sup>Departamento de Ciências Morfológicas, Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, Brasil

Correspondência: Dr. Luis Augusto Rohde, Serviço de Psiquiatria da Infância e Adolescência, HCPA. Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre - RS, Brasil.

Este estudo foi parcialmente financiado por verbas concedidas pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil) (Projeto 471761/03-6) Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX, Brasil) e Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Conflitos de interesse: O PRODAH recebe apoio de Bristol-Myers Squibb, Eli-Lilly, Janssen-Cilag e Novartis. Dr. Luis Augusto Rohde confere palestras ou é consultor das mesmas companhias.

## RESUMO

Um número reduzido de estudos investigou a associação de genes e a resposta clínica ao metilfenidato (MFD) no Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH). Em sua maioria, as evidências existentes relacionam-se a genes do sistema dopaminérgico e não há qualquer estudo avaliando efeitos adversos. O objetivo deste estudo é avaliar a associação de dois polimorfismos localizados no gene para a enzima dopamina- $\beta$ -hidroxilase (*DBH*) e um polimorfismo localizado no gene que codifica a proteína transportadora de noradrenalina (*NET1*) e a resposta clínica e a ocorrência de efeitos adversos ao tratamento com MFD em crianças e adolescentes com TDAH. Um número máximo de 106 crianças e adolescentes foi incluído nas análises. Foi detectada uma redução significativa dos escores *totais* de sintomas de TDAH durante os três meses de continuidade do tratamento ( $F=97.6$ ;  $P<0.001$ ). Foi detectada uma interação significativa entre homozigose para o alelo A2 e tempo em relação aos sintomas de *hiperatividade-impulsividade* durante o primeiro mês ( $n=83$ ;  $F=7.13$ ;  $P=0.009$ ) e o terceiro mês ( $n=80$ ;  $F=3.01$ ;  $P=0.05$ ) de tratamento com MFD. Não foram detectadas outras associações entre os polimorfismos avaliados e resposta ao MFD e ocorrência de efeitos adversos. São necessários mais estudos acerca de diferentes polimorfismos em genes noradrenérgicos e a resposta ao tratamento com MFD.

**Palavras-chave:** TDAH, transtorno de déficit de atenção/hiperatividade, farmacogenômica, farmacogenética, metilfenidato, estimulantes.

## INTRODUÇÃO

O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) é um distúrbio mental heterogêneo, caracterizado por sintomas marcados de desatenção, hiperatividade e impulsividade, presentes antes da idade escolar e que freqüentemente persistem durante a adolescência e a idade adulta (1). Aproximadamente 4% das crianças e adolescentes são afetadas em todo o mundo (2), havendo um importante comprometimento em diversos aspectos das suas vidas, com repercussões para a sociedade em geral (3).

A farmacoterapia com estimulantes, principalmente com o metilfenidato (MFD), está associada à redução dos sintomas e dos prejuízos em cerca de 70% das crianças inicialmente tratadas com esta medicação. Aproximadamente 30% das crianças não demonstram melhora ou não toleram os efeitos adversos, principalmente insônia e diminuição de apetite (4).

A etiologia do TDAH é fortemente associada a fatores genéticos (5). Análises conjuntas de estudos de gêmeos sugerem uma estimativa do coeficiente de herdabilidade de aproximadamente 0.8 (5). Baseados em dados neurobiológicos, estudos moleculares avaliaram extensamente o papel de genes dopaminérgicos, tais como o gene para o transportador de dopamina (*DAT1*) e os genes para os receptores dopaminérgicos D4 (*DRD4*) e D5 (*DRD5*) (6;7).

Evidências recentes embasam o papel do sistema noradrenérgico no TDAH (8;9). Estudos com modelos animais sugerem que projeções noradrenérgicas para o córtex pré-frontal (CPF) melhora funções como a memória de trabalho (10). Evidências farmacológicas indicam a importância do sistema noradrenérgico para

as atividades cognitivas nesta região cerebral, provavelmente relacionadas ao TDAH (9;11). A efetividade da atomoxetina, um inibidor altamente específico do transportador de noradrenalina, com mínima afinidade para outros transportadores ou receptores, também aponta para a importância desta via no TDAH (12).

A farmacogenômica tem o potencial de identificar a associação entre polimorfismos estruturais e eventos relacionados ao tratamento medicamentoso, tais como melhora clínica e efeitos adversos (13). Estudos de farmacogenética acerca do tratamento do TDAH implicaram genes dopaminérgicos na resposta ao MFD, principalmente *DAT1* e *DRD4* (14;15).

Até o momento, apenas dois estudos avaliaram genes noradrenérgicos. Hamarman et al. (16) avaliaram o polimorfismo *TaqI* no gene que codifica a enzima dopamina- $\beta$ -hidroxilase (D $\beta$ H). A D $\beta$ H catalisa a conversão da dopamina em norepinefrina. Alterações da atividade plasmática desta enzima foram detectadas em pacientes afetados por diversos transtornos mentais e neurológicos e variações alélicas em polimorfismos do gene para a enzima dopamina- $\beta$ -hidroxilase (*DBH*) estão relacionadas a variabilidade plasmática da atividade da D $\beta$ H (17). Os autores não encontraram efeito do polimorfismo avaliado sobre a dose necessária para melhora dos sintomas de TDAH (*A2-TaqI* presente: n=39; dose=39 mg/dia versus *A1-TaqI* ausente: n=6; dose=39 mg/dia; P=0.97) (16). O gene que codifica a proteína transportadora de noradrenalina (*NET1*) foi o outro gene do sistema noradrenérgico avaliado por através de um enfoque farmacogenômico. Em uma amostra de crianças chinesas com TDAH, Yang et al. (18) demonstraram que indivíduos com o alelo 1287G de um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no éxon 9 do *NET1* apresentaram redução

significativamente maior dos escores de hiperatividade-impulsividade do que indivíduos sem este alelo com o tratamento com MFD.

Buscamos avaliar a associação dos polimorfismos *DBH TaqI* e *HhaI* e *NET1 BslI* e a resposta clínica ao tratamento com MFD em uma amostra de crianças e adolescentes com TDAH.



## **MÉTODOS**

### **Delineamento**

Este é um estudo de associação aninhado em um quasi-experimento.

### **Sujeitos**

Foram convidadas a participar do estudo todas as crianças e adolescentes avaliados consecutivamente no Programa de Déficit de Atenção/Hiperatividade (PRODAH), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, durante dois anos. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital. Foi obtido consentimento por escrito dos pais e concordância verbal das crianças após esclarecimentos.

Os critérios de inclusão primários foram: a) diagnóstico de TDAH conforme os critérios do DSM-IV (1); b) idade entre 4 e 17 anos; c) etnia branca; d) ausência de uso prévio de MFD ao longo da vida; e) dose de MFD prescrita na avaliação inicial  $\geq 0.3$  mg/kg/dia. Sujeitos que preencheram os critérios diagnósticos do DSM-IV exceto pelo critério do início do prejuízo (sintomas causando prejuízo antes dos 7 anos de idade) foram incluídos, uma vez que pesquisas recentes não corroboram a validade deste critério (19;20).

### **Procedimentos diagnósticos e avaliações clínicas**

Os procedimentos diagnósticos adotados pelo PRODAH já foram extensamente descritos (21). Brevemente, o diagnóstico de TDAH e de comorbidades foi alcançado após um processo com três estágios: 1) entrevista clínica semi-estruturada (Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for

School-Age Children - Epidemiologic version [K-SADS-E]), 2) discussão diagnóstica em um comitê clínico, 3) avaliação clínica. As avaliações clínicas foram realizadas por psiquiatras da infância e adolescência no momento inicial, em 30 e 90 dias de tratamento com MFD.

As medidas primárias de desfecho para avaliação dos sintomas de TDAH foram as quatro sub-escalas da escala Swanson, Nolan e Pelham - versão IV (SNAP-IV) (escore *total*: 26 itens, *desatenção*: 9 itens, *hiperatividade-impulsividade*: 9 itens, *oposição*: 8 itens) pontuadas pelos pais. Os escores de oposição foram incluídos uma vez que o transtorno oposicional desafiante (TOD) encontra-se freqüentemente presente em crianças com TDAH (22). A SNAP-IV é baseada na pontuação dos sintomas em uma escala de 0 a 3 e vem sendo freqüentemente utilizada por investigações acerca do TDAH, inclusive por aquelas desenhadas para avaliar intervenções clínicas (23).

Os pais foram entrevistados quanto aos efeitos adversos através da Escala de Efeitos Adversos de Barkley (SERS). A SERS lista 17 efeitos adversos associados com estimulantes. A gravidade de cada sintoma é pontuado de 0 a 9 (24).

Os clínicos completaram a Escala de Avaliação Global de Crianças (CGAS) (25). A CGAS é uma medida de funcionamento global de crianças e adolescentes amplamente utilizada, com adequadas propriedades psicométricas (confiabilidade teste-reteste e entre entrevistadores e validade concorrente/discriminativa). A escala permite pontuações de 0 a 100, sendo escores mais altos relacionados a um melhor funcionamento global (25).

### **Intervenção farmacológica**

Os pacientes foram tratados de acordo com o protocolo do PRODAH (21). As doses foram aumentadas até que não houvesse possibilidade de melhora adicional ou até que surgissem efeitos adversos limitantes (21). Os psiquiatras eram cegos ao genótipo do paciente. As doses médias de MFD prescritas na avaliação inicial e na avaliação de 1<sup>o</sup> mês de tratamento foram de 0.5 e 0.65 mg/kg/dia, respectivamente.

### **Genotipagem**

Foi extraído DNA de alto peso molecular de linfócitos do sangue periférico através de um procedimento de *salting out* (26). Os polimorfismos foram amplificados através da reação em cadeia da polimerase (PCR), com *primers* e protocolos conforme previamente relatados para o *DBH TaqI* (27) e para o *DBH HhaI* (17), e conforme descrito abaixo para o *NET1 BstI*.

O gene *DBH* localiza-se no cromossomo 9q34, tem aproximadamente 23 kb de extensão e contém 12 exóns (28). A enzima *TaqI* identifica um polimorfismo bi-alelético gerado pela transição T → C no íntron 5, com uma banda não digerida de 464 pb (alelo A1: *TaqI* ausente) e duas bandas de 300 e de 164 pb (alelo A2: *TaqI* presente) (27). A enzima *HhaI* identifica um sítio de restrição na região promotora do *DBH*, criado pela transição C → T na posição -1,021. A digestão pela *HhaI* identifica uma banda não digerida de 130 pb (alelo C) ou duas bandas de 110 e de 20 pb (alelo T) (17).

O gene *NET1* localiza-se no cromossomo 16q12.1, sendo formado por 14 exóns, com um tamanho de cerca de 45 kb (29). A transição T → C localizada na

região promotora, a -182 pb (30), foi amplificada de acordo com os *primers* desenhados a partir do GenBank, sendo *forward* 5' CCC AAC CTC TGT TTC CCA AT 3' e *reverse* 5' CGA GGC TCT GCT TGG ATA AA 3'. As reações de PCR foram realizadas em volumes totais de 25  $\mu$ l, contendo 50 ng de DNA, 0.5  $\mu$ M de cada *primer*, 250  $\mu$ M de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1U de Taq DNA polimerase, e 1x de tampão Taq. As condições de PCR consistiram de um passo inicial de desnaturação a 94°C por 5 min, seguidos por 40 ciclos que incluíram desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 55°C por 30s, e extensão por 30s a 72°C, finalizando-se com uma extensão final a 72°C por 5 min. Dez  $\mu$ l dos produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose a 1.5% (1x tampão TBE, por 10 min a 120 V) para confirmar a amplificação. Os fragmentos de 177 pb obtidos foram então digeridos com a endonuclease de restrição *Bsl*I por 2 h a 55°C, utilizando 9  $\mu$ l do produto da PCR, 5 U da enzima, e 1x de tampão *Bsl*I. Os fragmentos digeridos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2.5% (1x tampão TBE por 1 h a 90 V). Os géis foram corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultra-violeta para leitura dos genótipos. A presença da base T não é reconhecida pela *Bsl*I, conservando-se o fragmento de 177 pb. Já a presença da base C é reconhecida pela enzima, dando origem a dois fragmentos de 132 pb e 45 pb.

### **Análises estatísticas**

As diferenças entre os grupos quanto a características demográficas, QI, subtipo de TDAH, comorbidades, uso prévio de medicação, escores basais nas

medidas de desfecho e dose prescrita de MFD foram comparadas através do teste de  $\chi^2$  ou do teste exato de Fisher (para variáveis categóricas) e do teste  $t$  de Student (para variáveis contínuas com distribuição normal).

Para analisar os escores nas sub-escalas da SNAP-IV, nas escalas CGAS e SERS, foi empregada ANOVA para medidas repetidas. Este teste estatístico assume que as observações não são independentes umas das outras havendo uma correlação entre elas, pois se referem a um mesmo sujeito em diferentes momentos do tempo. Dessa forma, foram examinados os efeitos do tempo, do grupo (baseado na presença de um alelo ou de um genótipo) e da interação entre ambos os fatores sobre os escores. Potenciais variáveis confundidoras foram definidas através da análise conceitual da literatura e/ou através de uma definição estatística (presença de associação com o fator em estudo e com o desfecho para um valor de  $P \leq 0.10$ ). Além disso, as análises de eficácia foram restringidas para pacientes com escores basais  $> 1$  nas sub-escalas da SNAP-IV ou  $< 71$  na CGAS, o que permitiu que houvesse possibilidade de melhora, estratégia implementada em investigações prévias (31;32).

Com o objetivo de evitarmos testes excessivos e incorrerem em erros tipo I, foi pré-definido um protocolo de análise: 1) foram analisados os dados referentes ao primeiro mês de tratamento e, se significantes em relação a um alelo de risco ou genótipo neste momento, só então foram analisados os dados referentes ao terceiro mês de tratamento através da ANOVA para medidas repetidas. Foi utilizada a estratégia de última observação levada para frente (*last observation carried forward*) com pacientes que não retornaram para avaliação do terceiro mês; 2) a amostra foi estratificada com o objetivo de refinar o fenótipo dos sujeitos

(de acordo com a presença de comorbidade, subtipo de TDAH, presença de transtorno de conduta ou transtorno de humor bipolar e gravidade dos sintomas) se resultados significantes fossem encontrados nas análises globais. Este enfoque garantiu análises conservadoras.

Nas análises secundárias, foram investigados os efeitos da interação entre genes na diferença dos escores (pré-tratamento – tratamento no 1º mês) totais na SNAP-IV através da ANOVA. Devido a restrições de tamanho amostral, foram avaliadas apenas interações dois a dois. Assim, foram testadas cinco possíveis interações em relação à resposta ao MFD: *DBH TaqI* (presença do alelo A2, genótipo A2A2), *DBH HhaI* (genótipo CC) e *NET1 BslI* (genótipo TT). As análises de interação foram realizadas no contexto do efeito principal dos alelos de risco individuais ou dos genótipos. Além disso, potenciais variáveis de confusão identificadas para ambos os polimorfismos individualmente foram incluídas nestas análises.

As análises foram conduzidas através do programa estatístico SPSS versão 12.0. Foi aceito um nível de significância de 5% em todas as análises (exceto para confundidores). Os testes foram bi-caudais.

## RESULTADOS

Durante o período de estudo, 116 pacientes foram incluídos (com dados disponíveis referentes à avaliação inicial e ao 1º mês de tratamento) (Tabela 1). Em relação às características iniciais, não foram detectadas diferenças significativas entre sujeitos incluídos e não incluídos em relação a gênero, idade, QI, subtipo de TDAH, perfil de comorbidades (transtornos de ansiedade, de humor), escores de funcionamento global, escores da SNAP-IV (respondida por pais e professores) e doses prescritas de MFD ( $P > 0.1$ ). Estes pacientes diferiram significativamente daqueles não incluídos no estudo apenas em relação à frequência de transtorno de conduta (16.4% versus 3.6%;  $P = 0.023$ ). As proporções de casos excluídos e a comparação com os incluídos também variaram conforme o desfecho investigado. Assim, realizamos comparações entre ambos os grupos de pacientes nas análises de todos alelos / genótipos e desfechos investigados (disponíveis mediante solicitação).

Através da ANOVA para medidas repetidas, detectamos uma redução significativa dos escores *totais* na SNAP-IV durante o período de acompanhamento ( $F = 94.9$ ;  $P < 0.001$ ), sugerindo a eficácia do tratamento. Houve uma diferença significativa entre os escores basais e no 1º mês ( $t = 10.11$ ;  $P < 0.001$ ), mas não entre os escores do 1º e do 3º mês ( $t = 1.53$ ;  $P > 0.05$ ). No 1º mês de tratamento com MFD, 55.3% dos pacientes alcançaram uma redução de 30% no escore *total* da SNAP-IV. Após três meses de tratamento, 59.4% dos pacientes apresentaram uma redução de 30% no escore *total* da SNAP-IV.

**DBH Taql**

As frequências alélicas calculadas foram de 0.42 para o alelo A1 e 0.58 para o alelo A2, considerando o número máximo de pacientes incluídos. As frequências genótípicas foram de 0.15, 0.54 e 0.31 para os indivíduos A1A1, A1A2 e A2A2, respectivamente. Estas frequências encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Não houve efeito da interação entre a presença do alelo A2 e o tempo em relação aos escores *total* (n=91; F=0.021; P=0.88), *desatenção* (n=106; F=0.2; P=0.65), *hiperatividade-impulsividade* (n=83; F=0.001; P=0.97), e *oposição* (n=66; F=0.001; P=0.98), bem como com os escores da CGAS (n=101; F=0.029; P=0.86) e da SERS (n=106; F=1.72; P=0.19) durante o 1º mês de tratamento com MFD. A variável gênero foi incluída como confundidora entre os grupos nas análises dos desfechos SNAP-IV sub-escala *desatenção* e CGAS.

Não houve efeito da interação entre o genótipo A2A2 e o tempo em relação aos escores *total* (n=91; F=3.08; P=0.83), *desatenção* (n=106; F=1.49; P=0.22), e *oposição* (n=66; F=3.12; P=0.082) da SNAP-IV, bem como com os escores da CGAS (n=101; F=1.08; P=0.29) e da SERS (n=106; F=0.7; P=0.4) durante o 1º mês de tratamento com MFD. Não houve variáveis confundidoras nestas análises. Entretanto, durante o 1º mês de tratamento com MFD, houve uma interação significativa entre o genótipo A2A2 e tempo detectada nos escores de *hiperatividade-impulsividade* (n=83; F=7.13; P=0.009). Esta interação também foi observada no 3º mês de tratamento (n=80; F=3.01; P=0.05). Indivíduos A2/A2, quando comparados aos indivíduos A2/A1 e A1/A1, alcançaram menor redução dos escores de *hiperatividade-impulsividade* da SNAP-IV no 1º mês (1.3 versus



1.17), mas maior redução destes escores no 3<sup>o</sup> mês (1 versus 1.14). Após a extratificação da amostra, a interação manteve-se apenas entre o genótipo A2/A2 e tempo em pacientes com subtipos *combinado + hiperativo-impulsivo* (n=62; F=6.73; P=0.012).

### **DBH HhaI**

As freqüências alélicas calculadas foram de 0.8 para o alelo C e 0.2 para o alelo T, considerando o número máximo de pacientes incluídos. As freqüências dos genótipos foram de 0.64, 0.31 e 0.05 para os indivíduos CC, CT e TT, respectivamente. Estas freqüências encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Não houve efeito da interação entre o genótipo CC e tempo em relação aos escores *total* (n=75; F=0.25; P=0.61), *desatenção* (n=82; F=3.53; P=0.64), *hiperatividade-impulsividade* (n=69; F=0.35; P=0.85) e *oposição* (n=56; F=0.92; P=0.76) da SNAP-IV, bem como com os escores da CGAS (n=79; F=0.13; P=0.71) e da SERS (n=85; F=0.31; P=0.57) durante o 1<sup>o</sup> mês de tratamento com MFD. A variável gênero foi incluída como variável de confusão entre os grupos na análise do escore da CGAS.

Devido à baixa freqüência de indivíduos sem o alelo C (5%), não realizamos comparações entre aqueles com e sem este alelo.

### **NET1 BslI**

As freqüências alélicas calculadas foram de 0.78 para o alelo T e 0.22 para o alelo C, considerando o número máximo de pacientes incluídos. As freqüências

dos genótipos foram de 0.59, 0.38 e 0.03 para os indivíduos TT, TC e CC, respectivamente. Estas frequências encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Não houve efeito da interação entre o genótipo TT e tempo em relação aos escores *total* (n=89; F=0.43; P=0.51), *desatenção* (n=99; F=0.84; P=0.36), *hiperatividade-impulsividade* (n=78; F=0.21; P=0.64) e *oposição* (n=61; F=0; P=0.99) da SNAP-IV, bem como com os escores da CGAS (n=94; F=0.68; P=0.4) e da SERS (n=101; F=0.001; P=0.97) durante o 1º primeiro mês de tratamento com MFD. Não houve variáveis confundidoras nestas análises.

Devido à baixa frequência de indivíduos sem o alelo T (3%), não realizamos comparações entre aqueles com e sem este alelo.

### **Interação entre genes**

Nas análises secundárias, exploramos o efeitos de todas as interações dois a dois em relação à resposta ao MFD. Não encontramos evidências de interação entre os polimorfismos estudados e redução no escore total da SNAP-IV após um mês de tratamento com MFD (P>0.05).

## DISCUSSÃO

Em um estudo de farmacogenética de crianças e adolescentes com TDAH tratadas com MFD, detectamos um efeito paradoxal do genótipo A2/A2 do polimorfismo *TaqI* do gene *DBH* sobre os escores de *hiperatividade-impulsividade* após 1 e 3 meses de tratamento. Não detectamos efeito deste polimorfismo sobre os outros desfechos avaliados, bem como dos polimorfismos *HhaI* do mesmo gene e *BsI* do gene *NET1* em relação à redução de sintomas do TDAH, melhora no funcionamento global e ocorrência de efeitos adversos após um mês de tratamento com MFD. Adicionalmente, não foram detectadas interações entre os polimorfismos estudados e resposta ao MFD.

Nossos achados positivos em relação ao efeito do polimorfismo *TaqI* do gene *DBH* em relação aos escores de *hiperatividade-impulsividade* vão de encontro a resultados prévios que sugerem que a dosagem necessária de MFD para que ocorra melhora de sintomas não encontra-se associada a este polimorfismo (16). Indivíduos com o genótipo A2/A2 apresentaram menor redução de sintomas deste domínio após 1 mês de tratamento com MFD (1.3 versus 1.17). Entretanto, após 3 meses de tratamento, apresentaram maior redução de sintomas de *hiperatividade-impulsividade* do que os indivíduos A2/A1 e A1/A1 (1 versus 1.14). Embora a estratégia de análise empregada tenha sido conservadora, não podemos descartar a possível natureza espúria deste achado. Não há nenhuma razão conceitual para que esperemos que a influência de um alelo ou de um genótipo sobre a resposta a um tratamento medicamentoso altere durante o tempo. Na mesma direção desta hipótese, estudos de genética molecular sugerem que o

papel do alelo A2 do polimorfismo *TaqI* no gene *DBH* no TDAH não seja restrito aos escores de *hiperatividade* (33).

Avaliamos também o polimorfismo *HhaI* na região promotora deste gene, que parece ser um importante marcador genético para a atividade plasmática da D $\beta$ H (17). Zhang et al. (34) avaliaram este polimorfismo em uma amostra de famílias chinesas com TDAH através do risco relativo de haplótipos (HRR). Os autores evidenciaram que o alelo T era um fator de risco para o TDAH combinado em meninos ( $P=0.02$ ). Em uma re-análise, demonstraram que o alelo T era preferencialmente transmitido em indivíduos com TDAH combinado com comorbidade com transtorno disruptivo do comportamento (TDC) ( $P<0.05$ ) e o alelo C em indivíduos com TDAH sem TDC ( $P<0.05$ ). Entre os três subtipos de TDAH, apenas indivíduos com TDAH subtipo combinado com TDC apresentaram um aumento da transmissão preferencial do alelo T ( $P=0.05$ ) (35). Os nossos achados em relação a este polimorfismo foram negativos.

Avaliamos um polimorfismo ainda não investigado (*BsII*) no gene *NET1*. Yang et al. (18) demonstraram a associação entre a presença do alelo 1287G e a redução significativamente maior dos escores de *hiperatividade-impulsividade* após tratamento com MFD. Nós avaliamos um polimorfismo diferente, localizado na região promotora deste gene. Na mesma direção que um recente estudo de associação com achados negativos em relação a este polimorfismo e TDAH (36), não encontramos uma associação entre este polimorfismo e resposta ao MFD.

Apenas um estudo prévio na literatura avaliou interações entre genes na área da farmacogenética do TDAH. Seeger et al. (37) relataram que pacientes com transtorno hipercinético que apresentaram o alelo de sete repetições do *DRD4* e

homozigose para o alelo de braço longo (L, inserção de uma seqüência de 44pb na região promotora do gene) no gene para o transportador de serotonina (5-*HTT*), isto é, indivíduos com o genótipo *DRD4\*7/5-HTT LL*, obtiveram menor redução no funcionamento global durante o tratamento com MFD. As nossas análises de todas as possíveis interações falharam em demonstrar efeitos destas na resposta ao MFD.

Como podemos integrar os nossos achados à literatura emergente acerca da farmacogenética do TDAH? É importante salientar que fomos capazes de localizar apenas dois estudos prévios na literatura que avaliaram o papel de genes do sistema noradrenérgico na resposta ao tratamento farmacológico para o TDAH. A interpretação mais simplista para os nossos achados é de que estes polimorfismos não apresentam efeitos sobre a resposta clínica e a ocorrência de efeitos adversos associados ao uso de MFD. Entretanto, não podemos excluir o fato de que não encontramos associações devido à falta de poder do estudo, mesmo que tenhamos avaliado possíveis efeitos destes genes na maior amostra de pacientes já publicada. Como demonstrado em estudos de associação (38), achados negativos e não replicação de achados positivos são esperados quando amostras não são muito grandes. É possível que isto ocorra em estudos de farmacogenômica. Além disso, realizamos análises de dados conservadoras a fim de evitarmos a identificação de associações espúrias. Como esperado, quando diminuimos a chance de incorrerem em Erro tipo I aumentamos a chance de incorrerem em Erro tipo II.

Mesmo considerando estas questões que potencialmente possam ter influenciado os resultados, nosso estudo avançou em relação às investigações

prévias de farmacogenética do TDAH. Incluímos um número de pacientes maior em relação aos estudos já realizados e pela primeira vez foi estudada a associação de polimorfismos com a ocorrência de efeitos adversos. Ao analisarmos os efeitos de alelos ou de genótipos, consideramos cuidadosamente os efeitos de possíveis vieses de seleção sobre os nossos achados e realizamos, então, comparações entre sujeitos incluídos e excluídos quanto a diversas variáveis, uma estratégia não usualmente empregada por estudos de genética molecular e de farmacogenética do TDAH. Finalmente, a seleção dos genes avaliados neste estudo foi baseada em efeitos documentados e/ou potenciais no TDAH (*DBH TaqI* e *NET1 BslI*) ou com demonstrada funcionalidade (*DBH HhaI*).

Embora seja importante estudarmos polimorfismos de nucleotídeos únicos em genes candidatos razoáveis, deve ser considerado que o seu efeito provável é certamente pequeno, mesmo que relacionado à resposta à medicação. Assim, para o crescimento deste campo da ciência, esforços entre diferentes grupos são necessários com o objetivo de estudarmos um maior número de pacientes, como aquele atualmente em desenvolvimento através do ADHD Molecular Genetics Network. Ainda, varreduras genômicas devem incorporar a resposta à medicação como um desfecho para as suas análises. Finalmente, uma vez que dados de estudos neurobiológicos e farmacológicos indicam a importância do sistema noradrenérgico na patofisiologia e tratamento do TDAH, outros estudos farmacogenômicos focados nestes genes e nas interações entre eles e entre o ambiente devem ser realizados.

## REFERÊNCIAS

- (1) American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Diseases, fourth edition (DSM-IV). Washington, DC: APA, 1994.
- (2) Polanczyk G, Lima MS, Horta B, Rohde LA. The worldwide prevalence of ADHD: What are the real sources of variation in its estimates. A systematic review and meta-regression analysis. 16<sup>th</sup> World Congress of the International Association for Child and Adolescent Psychiatry and Allied Professions. Berlin, German; 2004.
- (3) National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Diagnosis and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2000; 39:182-193.
- (4) Swanson JM, Kraemer HC, Hinshaw SP et al. Clinical relevance of the primary findings of the MTA: success rates based on severity of ADHD and ODD symptoms at the end of treatment. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2001; 40(2):168-179.
- (5) Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE et al. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 2005; 57(11):1313-1323.
- (6) Kirley A, Hawi Z, Daly G et al. Dopaminergic system genes in ADHD: toward a biological hypothesis. *Neuropsychopharmacology* 2002; 27(4):607-619.
- (7) Bobb AJ, Castellanos FX, Addington AM, Rapoport JL. Molecular genetic studies of ADHD: 1991 to 2004. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005; 132(1):109-125.
- (8) Arnsten AF, Li BM. Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biol Psychiatry* 2005; 57(11):1377-1384.
- (9) Biederman J, Spencer T. Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) as a noradrenergic disorder. *Biol Psychiatry* 1999; 46(9):1234-1242.
- (10) Arnsten A, Li B. Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biol Psychiatry* 2005; in press.
- (11) Jakala P, Sirvio J, Riekkinen M et al. Guanfacine and clonidine, alpha 2-agonists, improve paired associates learning, but not delayed matching to sample, in humans. *Neuropsychopharmacology* 1999; 20(2):119-130.
- (12) Spencer T, Heiligenstein JH, Biederman J et al. Results from 2 proof-of-concept, placebo-controlled studies of atomoxetine in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychiatry* 2002; 63(12):1140-1147.
- (13) Weinshilboum R. Inheritance and drug response. *N Engl J Med* 2003; 348(6):529-537.

- (14) Polanczyk G, Zeni C, Genro J, Roman T, Hutz MH, Rohde L A. Attention-deficit/hyperactivity disorder: advancing on pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 2005; 6(3):225-234.
- (15) Rohde L A, Zeni C, Polanczyk G, Hutz MH. New insights on attention-deficit/hyperactivity disorder pharmacogenomics. *Drug Dev Res* 2004; 62(3):172-179.
- (16) Hamarman S, Ulger C, Fossella J, Brimacombe M, Dermody J. Influence of dopamine genes on stimulant response in ADHD children. 50th Annual Meeting of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry. Miami, USA, 2003.
- (17) Zabetian CP, Anderson GM, Buxbaum SG et al. A quantitative-trait analysis of human plasma-dopamine beta-hydroxylase activity: evidence for a major functional polymorphism at the DBH locus. *Am J Hum Genet* 2001; 68(2):515-522.
- (18) Yang L, Wang YF, Li J, Faraone SV. Association of norepinephrine transporter gene with methylphenidate response. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2004; 43(9):1154-1158.
- (19) Barkley RA, Biederman J. Toward a broader definition of the age-of-onset criterion for attention-deficit hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1997; 36(9):1204-1210.
- (20) Rohde LA, Biederman J, Zimmermann H, Schmitz M, Martins S, Tramontina S. Exploring ADHD age-of-onset criterion in Brazilian adolescents. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2000; 9(3):212-218.
- (21) Rohde LA. ADHD in Brazil: the DSM-IV criteria in a culturally different population. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2002; 41(9):1131-1133.
- (22) Souza I, Pinheiro MA, Denardin D, Mattos P, Rohde LA. Attention-deficit/hyperactivity disorder and comorbidity in Brazil: comparisons between two referred samples. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2004; 13(4):243-248.
- (23) A 14-month randomized clinical trial of treatment strategies for attention-deficit/hyperactivity disorder. The MTA Cooperative Group. Multimodal Treatment Study of Children with ADHD. *Arch Gen Psychiatry* 1999; 56(12):1073-1086.
- (24) Barkley RA. *Attention-Deficit Hyperactivity Disorder: A Handbook for Diagnosis and Treatment*. New York: Guilford Press, 1990.
- (25) Shaffer D, Gould MS, Brasic J et al. A children's global assessment scale (CGAS). *Arch Gen Psychiatry* 1983; 40(11):1228-1231.
- (26) Lahiri DK, Nuerberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; 19:5444.



- (27) Daly G, Hawi Z, Fitzgerald M, Gill M. Mapping susceptibility loci in attention deficit hyperactivity disorder: preferential transmission of parental alleles at DAT1, DBH and DRD5 to affected children. *Mol Psychiatry* 1999; 4(2):192-196.
- (28) Kobayashi K, Kurosawa Y, Fujita K, agatsu T. Human dopamine beta-hydroxylase gene: two mRNA types having different 3-prime-terminal regions are produced through alternative polyadenylation. *Nucleic Acids Res* 1989; 17:1089-1102.
- (29) Porzgen P, Bonisch H, Bruss M. Molecular cloning and organization of the coding region of the human norepinephrine transporter gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 215(3):1145-1150.
- (30) Zill P, Engel R, Baghai TC et al. Identification of a naturally occurring polymorphism in the promoter region of the norepinephrine transporter and analysis in major depression. *Neuropsychopharmacology* 2002; 26(4):489-493.
- (31) Roman T, Szobot C, Martins S, Biederman J, Rohde LA, Hutz MH. Dopamine transporter gene and response to methylphenidate in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pharmacogenetics* 2002; 12(6):497-499.
- (32) Winsberg BG, Comings DE. Association of the dopamine transporter gene (DAT1) with poor methylphenidate response. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1999; 38(12):1474-1477.
- (33) Roman T, Schmitz M, Polanczyk GV, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH. Further evidence for the association between attention-deficit/hyperactivity disorder and the dopamine-beta-hydroxylase gene. *Am J Med Genet* 2002; 114(2):154-158.
- (34) Zhang HB, Wang YF, Li J, Wang B, Yang L. [Association of dopamine beta-hydroxylase polymorphism with attention deficit hyperactivity disorder in children]. *Beijing Da Xue Xue Bao* 2004; 36(3):290-293.
- (35) Zhang HB, Wang YF, Li J, Wang B, Yang L. [Association between dopamine beta hydroxylase gene and attention deficit hyperactivity disorder complicated with disruptive behavior disorder]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2005; 43(1):26-30.
- (36) Xu X, Knight J, Brookes K et al. 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* 2005; 134(1):115-118.
- (37) Seeger G, Schloss P, Schmidt MH. Marker gene polymorphisms in hyperkinetic disorder--predictors of clinical response to treatment with methylphenidate? *Neurosci Lett* 2001; 313(1-2):45-48.
- (38) Faraone SV, Biederman J, Monuteaux MC. Toward guidelines for pedigree selection in genetic studies of attention deficit hyperactivity disorder. *Genet Epidemiol* 2000; 18(1):1-16.

**Tabela 1. Características demográficas e clínicas dos sujeitos incluídos (n=116)**

Idade - média (DP)	10.2 (3.1)
Meninos - n (%)	88 (76)
QI - média (DP)	94.3 (14.8)
TDAH (subtipos) - n (%)	
combinado	66 (56.8)
desatento	30 (25.9)
hiperativo-impulsivo	9 (7.8)
sublimiar	11 (9.5)
Transtornos comórbidos – n (%)	
TC	19 (16.4)
TOD	57 (49.1)
Transtornos do humor	10 (8.7)
Transtornos de ansiedade	26 (22.4)
CGAS - média (DP)	60.6 (11.3)
SNAP-IV escores basais - média (DP)	
total	1.6 (0.57)
desatenção	1.92 (0.57)
hiperatividade-impulsividade	1.55 (0.79)
oposição	1.3 (0.74)
SERS escores basais - média (DP)	33.6 (21)
Uso prévio de medicação - n (%)	7 (6)
Prescrição de outra medicação - n (%)	10 (8.6)
Dose basal de MFD prescrita - média (DP)	0.5 (0.15)
Dose de MFD prescrita no 1 <sup>o</sup> mês - média (DP)	0.65 (0.20)

DP = desvio padrão; n = número absoluto; QI = coeficiente de inteligência; TDAH = transtorno de déficit de atenção/hiperatividade; TC = transtorno de conduta; TOD = transtorno oposicional desafiante; MFD = metilfenidato.

## 8 CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou o efeito do polimorfismo *ADRA2A MspI* na redução de sintomas de desatenção em crianças e adolescentes com TDAH tratados com MFD durante três meses de acompanhamento. Não encontramos associações entre este polimorfismo e os demais desfechos avaliados, bem como associações consistentes ou significativas dos polimorfismos *DBH TaqI*, *DBH HhaI* e *NET1 BslI* ou da interação entre eles e melhora sintomatológica, melhora do funcionamento global ou ocorrência de efeitos adversos em resposta ao tratamento com MFD.

As evidências clínicas consistentes encontradas quando à importância do *ADRA2A* corroboram dados bioquímicos, neurobiológicos e farmacológicos existentes e indicam a necessidade de mais estudos acerca da participação deste gene e do sistema noradrenérgico na resposta clínica ao tratamento com MFD e na fisiopatologia do TDAH. Nossos achados positivos em relação ao efeito do polimorfismo *TaqI* do gene *DBH* em relação aos escores de hiperatividade-impulsividade são contraditórios, uma vez que indivíduos com o genótipo A2/A2 apresentaram menor redução dos sintomas deste domínio após 1 mês de tratamento com MFD e maior redução destes sintomas após 3 meses de tratamento. Embora a estratégia de análise empregada tenha sido conservadora, não podemos descartar a possível natureza espúria deste achado, já que não há razão conceitual que justifique a inversão do efeito de um alelo ou de um genótipo sobre a resposta a um tratamento medicamentoso ao longo do tempo.

Uma revisão crítica da literatura acerca da farmacogenética do TDAH indica claramente inúmeras limitações, como: a) número reduzido de estudos; b) diversas metodologias empregadas; c) preponderância de estudos que avaliam SNPs em detrimento de estudos que avaliam haplótipos ou interações entre genes; d) preponderância de estudos que avaliam resposta somente ao MFD; e) tamanhos amostrais com baixo poder para detectar associações significativas de pequeno efeito; f) ausência de estudos que avaliam a correlação entre genes e efeitos adversos; g) ausência de estudos que avaliam a interação de genes e ambiente em relação à resposta e aos efeitos adversos a medicações usadas no tratamento do TDAH; h) ausência de estudos que avaliam o metabolismo das medicações.

A discussão a respeito da possível aplicação destes resultados na prática clínica deve ser amparada em cuidados éticos. É importante tornar claro aos pacientes incluídos nos estudos que estamos distantes do momento em que incorporaremos os resultados destas pesquisas à prática clínica. Achados futuros advindos de estudos de farmacogenética podem colaborar para identificar subgrupos de pacientes que necessitam ser tratados inicialmente com outras medicações, como antidepressivos tricíclicos e atomoxetina.

Para lidar com estes desafios, esperamos que novas metodologias sejam incorporadas ao campo da farmacogenética, como a varredura genômica e a investigação de haplótipos. Ao mesmo tempo, acreditamos que esforços conjuntos

entre diferentes grupos de pesquisa possam ser implementados no sentido de agregar amostras e conhecimentos, o que conferirá maior poder aos estudos.

**ANEXO 1****Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: Recent Advances on  
Pharmacogenomics**

Guilherme Polanczyk, M.D.<sup>1</sup>; Cristian Zeni, M.D.<sup>1</sup>; Julia P. Genro, B.Sc.<sup>2</sup>; Tatiana Roman, Ph.D.<sup>3</sup>; Mara H. Hutz, Ph.D.<sup>2</sup>; Luis Augusto Rohde, M.D, D.Sc.<sup>2</sup>

Pharmacogenomics 2005; 6(3): 225-234.

<sup>1</sup>ADHD outpatient clinic, Child and Adolescent Psychiatric Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Morphological Sciences, Federal School of Medical Sciences of Porto Alegre, Brazil. Correspondence to: Dr. Luis Augusto Rohde, Serviço de Psiquiatria da Infância e Adolescência, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Zip code: 90035-003.

This work was partially supported by research grants from: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) (Grant 471761/03-6) Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX, Brazil), and Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

---

**Conflict of Interest:** The ADHD outpatient program receives research support from the following pharmaceutical companies: Bristol-Myers Squibb, Eli-Lilly, Janssen-Cilag, and Novartis. Dr. Rohde is on the speakers' bureau or is a consultant for the same companies.

**Running title:** Recent Advances on ADHD pharmacogenomics

**Key-words:** ADHD, pharmacogenomics, pharmacogenetics, genetics, methylphenidate, stimulants, *DAT1* gene, *ADRA2A* gene

**Highlights:**

- ADHD is a disorder with a strong participation of genetics in its etiology (estimates of heritability of approximately 0.80) and a high rate of response to medication (more than 70 % of the patients have good response to medication).
- Few studies on the pharmacogenomics of ADHD were conducted. The majority of investigations are on individual polymorphisms at dopaminergic genes.
- Almost all studies assess the effects of genes in the response to methylphenidate.
- Preliminary findings are contradictory even for the VNTR polymorphism in the 3' untranslated region at *DAT1* gene (the most assessed polymorphism). However, findings from some studies with different samples seem to suggest that 10/10 homozygous subjects would display less improvement of ADHD symptoms than individuals with other genotypes. According to some neuroimaging investigations, this lower effect might be related to a higher density of the dopamine transporter (or a more active dopamine transporter) in 10/10 individuals than in subjects without this genotype.
- Few investigations addressed the role of non-dopaminergic genes, or gene to gene interactions in ADHD pharmacogenomics. Preliminary data suggest an association between response to MPH and an *MspI* polymorphism in the promoter region of the *ADRA2A* gene. Another study suggests different responses to MPH in hyperactive-impulsive scores according to *NET1* gene G1287A genotypes.
- Comparability between studies is difficult due to completely different methodologies. Multi-site collaborative efforts to obtain larger samples with standardized methodology should be encouraged.

## ABSTRACT

Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) is a very prevalent heterogeneous psychiatric disorder. An impressive literature documents both a strong participation of genetics in its etiology and a high rate of response to medication. However, few studies on the pharmacogenomics of ADHD were conducted. This systematic review aims to present a critical discussion of findings from recent investigations on this emerging area of research. The majority of investigations are on individual polymorphisms at dopaminergic genes, especially on polymorphisms at the dopamine transporter gene (*DAT1*). Almost all studies assess the effects of genes in the response to methylphenidate (MPH). Some preliminary results suggest the association between the homozygosity for the 10-repeat allele at *DAT1* and poor response to methylphenidate. However, other studies reported contrasting findings. Very few investigations addressed the role of non-dopaminergic genes, or gene to gene interactions in ADHD pharmacogenomics. Recent findings from our lab suggesting an association between response to MPH and an *MspI* polymorphism in the promoter region of the *ADRA2A* gene are discussed. Pharmacogenomic studies of ADHD are in their infancy. Comparability between studies is difficult due to completely different methodologies. Multi-site collaborative efforts to obtain larger samples with standardized methodology should be encouraged.



## INTRODUCTION

Although Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) is a heterogeneous disorder, the core symptoms include marked inattention, hyperactivity and impulsivity [1]. A recent systematic review of the literature on the prevalence of ADHD was able to document the presence of the disorder worldwide [2]. In non-referred samples of school-age children, the prevalence of ADHD is between 3% and 6%, and its symptoms persist in more than 60% of patients in adolescence and adulthood [3,4,5]. The disorder is associated with morbidity and disability across the life cycle and has a severe social impact [6].

Findings from several research approaches including neuroimaging, neurochemical, and molecular genetic investigations provide a strong evidence for the validity of ADHD as a syndrome with important neurobiological bases (see for a revision, Castellanos and Tannock, 2002) [7]. Family, twin and adoption studies strongly support a role for genetic components in the etiology of the disorder. These studies documented a moderate to high heritability. In this regard, twins' studies converge on estimates of heritability of approximately 0.80 [8]. As in several neuropsychiatric disorders, the vulnerability is likely to be due to many genes, each of them with a small effect [9].

Pharmacotherapy is a fundamental component in the treatment of ADHD. Many studies have clearly documented the efficacy of stimulants (e.g., methylphenidate) in reducing the symptoms of ADHD, as well as in improving the

functioning of several other domains. The methylphenidate's mechanism of action, although not completely understood, involves inhibition of the dopamine transporter [10,11]. In addition, emerging amounts of data have been published supporting the efficacy of atomoxetine (a newly developed non-stimulant drug) in the treatment of ADHD. Atomoxetine is a highly specific inhibitor of the noradrenaline transporter with minimal affinity for other noradrenergic receptors or other neurotransmitter transporters or receptors [12,13].

Pharmacogenetics refers to the understanding of the hereditary basis for variability in response and adverse drug reactions to pharmacological agents among individuals [14]. The scope of pharmacogenomics involves the study of the link between structural polymorphism in genes and variable response to drugs [15]. Although there is an impressive literature documenting both a strong participation of genetics in the etiology of the disorder and a high rate of response to stimulants and atomoxetine, surprisingly few studies on pharmacogenomics of ADHD were conducted [16].

This review aims to present a critical discussion of findings from recent investigations on this emerging new area of research, the pharmacogenomics of ADHD. To accomplish this task, we performed a systematic computer review of the literature using three data bases: PubMed, PSYCHINFO, and Scielo (Scientific Library on Line). References were searched using the following strategy: pharmacogen\*[Title/Abstract] AND (ADHD[Title/Abstract] OR attention-deficit [Title/Abstract] OR attent\*[Title/Abstract] OR hyperact\*[Title/Abstract] OR

methylphenidate [Title/Abstract] OR atomoxetine[Title/Abstract] OR amphetamine[Title/Abstract]). All abstracts, including those in other languages than English were suitable for revision. We extensively checked all references from the papers found through this process. In addition, we contacted several research centers worldwide involved in research on ADHD genetics asking for any kind of non-published data relevant for the topic of this revision. This review strategy determined 66 abstract to be reviewed; 9 presented non-duplicated research findings on ADHD pharmacogenomics; 8 were reviews of the literature. Contact with other investigators resulted in more 6 studies presented in medical meetings or yet non-published. The pharmacogenomic data on ADHD are presented in five sections: a) Studies of the association between individual polymorphisms and response to stimulants; b) investigations on gene to gene interaction and genome-wide scans; c) studies addressing neuroimaging, response to medication and individual polymorphisms; d) expert opinion; e) outlook.

#### **a) STUDIES OF THE ASSOCIATION BETWEEN INDIVIDUAL POLYMORPHISMS AND RESPONSE TO STIMULANTS**

In Table 1, a description of all investigations on the association between polymorphisms at different genes and response to methylphenidate (MPH) in ADHD subjects can be found.

## Dopaminergic genes

Dopamine genes have been the initial candidates for molecular studies, based on animal models, imaging data and the efficacy of stimulant treatment for ADHD. The dopamine D4 receptor gene (*DRD4*) and the dopamine transporter gene (*DAT1*) were the most studied. In both genes, the main polymorphisms investigated in association studies with ADHD are variable number of tandem repeats (VNTR). In the *DRD4* gene, this VNTR is a 48bp sequence in the third exon that can be repeated 2 to 11 times. This 48bp polymorphism shows considerable ethnic variability, but 2, 4 and 7-repeat alleles are the most common variants across different populations. The VNTR at *DAT1* gene is a 40bp sequence in the 3' untranslated region. Ten different alleles can be found, according to the presence of 3 to 13 copies of the 40bp unit. The 10-repeat allele, the most prevalent variant worldwide, has been implicated as the risk allele for ADHD (for a review see Roman et al., 2004) [17]. Two recent meta-analyses support a small effect of both genes in ADHD (significant effect for the 7-repeat allele at *DRD4* locus; a trend for the 10-repeat allele at *DAT1* locus) [18, Waldman et al., unpublished].

### Dopamine transporter gene (*DAT1*)

In a pioneer study, Winsberg and Comings [19] found that homozygosity of the 10-repeat allele at *DAT1* gene was associated with a poor response to MPH in 30 African-American children with ADHD. However, potential confounding

variables between the two groups (subjects with and without the homozygosity for the 10 repeat allele) were not extensively assessed and response was only defined dichotomously (decrease close or higher than 50% of ADHD symptoms).

Our group was able to replicate this previous finding in a sample of Brazilian ADHD boys [20]. In a blind naturalistic study, 50 male ADHD youths were treated with MPH. While 75% (15/20) of the youths without 10/10 genotype demonstrated an improvement in the core symptoms of the disorder higher than 50% with MPH, only 47% (14/30) of the subjects with 10/10 genotype achieved the same level of improvement with this medication (one-tailed  $p = 0.04$ ). In addition, the group without this genotype had significantly higher improvement in global functioning than the other group (one-tailed  $p < 0.01$ ). It is important to note that no significant differences were found between groups in age, ethnicity, educational level, IQ, baseline, ADHD symptomatology and global functioning, type of ADHD and main comorbidities, median length of time between scales administration and in the initial and final doses of MPH.

Although interesting, these two ADHD pharmacogenomic studies should be understood with some caution. Recently, different groups reported contrasting findings when assessing the effect of *DAT1* on the response to MPH in ADHD children. In a sample of 102 Dutch ADHD patients treated with MPH, no association was found between the presence of *DAT1* 10-repeat risk alleles and response to medication [J.K. Buitelaar, personal communication]. In addition, Hamarman et al. [21] found that ADHD subjects homozygous for the 10-repeat at

*DAT1* gene (n =15) required similar stimulant dosing compared to children with one or no 10-repeats (n = 30) for normalization of ADHD symptoms (39mg versus 38mg; p = 0.62). Kirley et al. [22] found a significant association between the 10-repeat allele and better response to MPH in a sample of 119 Irish children with ADHD ( $\chi^2 = 7.92$ , df =1, p = 0.005), while Stein et al. [23] found a worse response to MPH associated with homozygosity of the 9-repeat allele at *DAT1* in a sample of 43 ADHD children.

More recently, Lott et al. [24] assessed 96 normal volunteers using self-report measures on subjective effects of amphetamine in a randomized, double-blind, cross-over trial with placebo and two different oral doses of d-amphetamine. In 9/9 and 10/10 subjects, amphetamine was associated with increased anxiety, euphoria and feel drug, as expected (p < 0.01). However, 9/9 subjects when using amphetamine (n = 8) presented indistinguishable subjective effects from those found during the use of placebo. These findings suggesting that the 9/9 genotype is associated with diminished subjective response to acute amphetamine concur with those from the study of Stein et al. [23] in which the worst response to MPH was associated with homozygosity of the 9-repeat allele.

#### Dopamine receptor - type 4 (*DRD4*) gene

In a pioneer study, Tahir et al. [25] presented an indirect evidence of the association between the 7-repeat allele at the *DRD4* gene and response to MPH in ADHD patients. In a sample of 111 Turkish ADHD children, the association

between the 7-repeat allele and ADHD was stronger in subjects who were responders to the medication than in non-responders. Similar findings were detected for *DRD5* gene. However, it is important to note that control for other potential confounding variables was not performed in that study, making an interpretation of these findings difficult.

Hamarman et al. [26] found that subjects with the 7-repeat allele at the *DRD4* gene achieved less normalization of symptoms at MPH doses of 50 mg/day and required 1.5 times more MPH to achieve improvement than those without the 7-repeat allele in a sample of 45 ADHD children (respectively,  $p = 0.002$  and  $p < 0.001$ ). However, no association was found between the presence of the 7-repeat allele at *DRD4* gene and response to MPH in 30 African-American children with ADHD in the above mentioned study of Winsberg and Comings [19].

### **Noradrenergic genes**

Besides dopaminergic theories, there are also strong evidences implicating the noradrenergic system in ADHD. Some recent findings have indicated a role for genes of the noradrenergic system, like the Dopamine- $\beta$ -Hydroxylase (DBH) and *ADRA2A* genes, in the pathophysiology of ADHD [27,28,29]. The polymorphism in the DBH gene assessed in the majority of the studies was a *TaqI* polymorphism in the intron 5. A *MspI* restriction fragment length polymorphism (RFLP) in the promoter region of the *ADRA2A* gene, originated by a C  $\rightarrow$  G transversion at position – 1291 was the one evaluated in the study of Roman et al. [29]. In the

investigation of Park et al. [27], besides the polymorphism mentioned above, two others were assessed: a *HhaI* RFLP in the 5'UTR, and a *DraI* RFLP in the 3'UTR of the *ADRA2A* gene.

Almost nothing has been published or presented on the association of noradrenergic genes and response to methylphenidate in ADHD children and adolescents. Regarding the *DBH* gene, Hamarman et al. [21] found that the intron 5 *TaqI* polymorphism had no effect on doses of MPH needed to normalize symptoms in ADHD children (*A2-TaqI* present;  $n = 39$ ; dose = 39mg/day versus *A1-TaqI* absent;  $n = 6$ : dose = 39mg/day;  $p=0.97$ ). Recently, Yang et al. [30] assessed a sample of 45 Chinese Han youths with ADHD treated with MPH in doses of 0.45-0.60mg/kg/day. They found a significant association between noradrenaline transporter (*NET1*) gene G1287A genotypes and response to MPH for hyperactive-impulsive scores but not for inattentive scores. Subjects with G/G and G/A genotypes showed greater symptom reductions ( $7.15\pm 4.25$  and  $6.94\pm 5.60$ ) than those with A/A genotypes ( $2.13\pm 4.29$ ) ( $p = 0.01$ ).

We have just finished a naturalistic study to assess the role of different single nucleotide polymorphisms (SNPs) in three noradrenergic genes (*NET1*, *ADRA2A*, *DBH*) for the response to MPH in ADHD children and adolescents. All ADHD patients seen in our ADHD outpatient program during the study period fulfilling the following criteria were included: a) ADHD diagnosis according to DSM-IV criteria [1]; b) age between 4 and 17 years-old; c) European-Brazilian ethnicity; d) drug naïve for MPH and without use of any medication in the previous 4 weeks before



baseline assessment; e) baseline total scores in a widely used standardized measure of ADHD (SNAP-IV) [31] higher than 1; f) prescribed dose of MPH equal or higher than 0.3 mg/kg/day. Up to this moment, preliminary analyses were conducted only for the *MspI* RFLP in the promoter region of the *ADRA2A* gene. For the 144 patients fulfilling inclusion criteria, we were able to successfully genotype 97 ADHD children and adolescents (for the 47 subjects not genotyped: 16 parents refused to participate in the study; 7 children had needle phobia; 19 were either referred after baseline assessment, lost at follow-up, or unavailable for genotyping; 2 incorrect application of the SNAP-IV scale; and 1 problems in genotyping). No significant difference were detected on age, IQ, gender, ADHD type, baseline total scores in the SNAP-IV scale (parent and teacher scores), used dose of MPH between those included or not in the study. For those 97 genotyped for the *MspI* RFLP in the promoter region at the *ADRA2A*, 14 were homozygous for the G allele (former m allele). No significant differences were found between the 14 patients homozygous for the G allele and the 83 with other genotypes (44 heterozygous and 39 homozygous for the C allele) on IQ, gender, ADHD type, baseline total scores in the SNAP-IV scale (parent and teacher scores), any comorbid condition (disruptive, anxiety or mood disorders), previous or concomitant use of medication, and used dose of methylphenidate. However, ADHD patients homozygous for the G allele were younger than those with other genotypes ( $p < 0.01$ ). In ANOVA analyses, GG homozygosis was significantly associated with higher total scores in the SNAP-IV at 1 month reassessment even adjusting for the effects of age ( $p = 0.04$ ) [GG subjects: mean (SD) total score in the SNAP-IV = 1.39 (0.51); GG/GC subjects: mean (SD) total score in the SNAP-IV = 1.08 (0.5)]. No effects were

detected for age or the interaction between age and mm homozygosis in the SNAP-IV total scores at 1 month reassessment.

## **b) GENE TO GENE INTERACTION AND GENOME-WIDE SCAN STUDIES**

Since ADHD is best conceptualized as a complex disorder with many implicated genes, each contributing a small fraction to the total genetic variance, studies on individual genetic polymorphisms certainly are not the best approach for understanding the pharmacogenomics of ADHD. One way to address this complex picture is conducting gene to gene interaction studies. We were able to find just one investigation in the literature dealing with gene to gene interaction in the ADHD pharmacogenomics arena. Seeger et al. [32] reported that patients with hyperkinetic disorder (an ICD-10 nomenclature that include a subgroup of the DSM-IV ADHD diagnosis) who presented both the 7-repeat allele at the *DRD4* locus and homozygosity for the long allele (L, insertion of a 44bp sequence in the promoter region) at the serotonin transporter gene (*5-HTT*), i.e., individuals with the *DRD4\*7/5-HTT* LL genotype, showed a reduced improvement in general functioning during MPH treatment. Although the serotonergic system does not seem to be primarily involved in the pathophysiology of ADHD, it is important to note that at least three previous investigations found evidences for the role of the long allele at *5-HTT* gene as a susceptibility allele for ADHD (for a revision, see Kent et al., 2002) [33].

Recently, Van der Meulen et al. [34] reported the first genome-wide quantitative trait locus analysis on MPH response rate in Dutch sib pairs with ADHD. A group of 102 Dutch ADHD children from a sib-pair sample was recently treated with methylphenidate. A quantitative trait locus (QTL) analysis with Genehunter was used to test for linkage on methylphenidate response rate in a genome-wide scan, using 400 markers with an average distance of 10 cM. In a nonparametric QTL analysis a maximum Z-score of 2.60 was found on chromosome 7, corresponding with a LOD-score of 2.63 in a traditional Haseman-Elston analysis. Additional peaks with Z-scores of 2.74, 2.61 and 2.37 and corresponding LOD-scores of 1.95, 1.90 and 2.09 were found on chromosome 3, 5 and 9, respectively. As stated by the authors, due to the relatively small size of the current sample, the peak regions on these chromosomes still warrant further research (in a genome wide QTL analysis, the threshold for significance is generally believed to correspond with  $Z=4.1$  and  $LOD=3.6$ ).

### **c) STUDIES ADDRESSING NEUROIMAGING, RESPONSE TO MEDICATION AND GENETIC POLYMORPHISMS;**

Due to the extreme phenotypic variability found in ADHD, efforts to define endophenotypes for the disorder have been made with the aim to reduce this source of heterogeneity. In this sense, it has been proposed that neuroimaging studies have the potential to facilitate the search for these endophenotypes in ADHD [7]. Some preliminary studies assessed pharmacogenomics of ADHD taking advantage of neuroimaging or even electroencephalogram (EEG) techniques.

In a pilot study, Rohde et al. [35] assessed male children with ADHD that were MPH-naïve and presented at least moderate response to MPH in a naturalistic study. A significantly higher regional cerebral blood flow (rCBF) in medial frontal and left basal ganglia areas in children with homozygosity for the 10-repeat allele at *DAT1* than in children without the 10/10 genotype was found after 4 days of treatment with MPH (final doses = 0.7 mg/kg/day) (for both areas:  $p = 0.02$ ). In addition, a trend for a higher rCBF in right and left frontal areas was detected in children with the 10/10 genotype than in children without this genotype (for both areas:  $p = 0.08$ ).

Recently, Cheon et al. [36] went a step further in a more sophisticated protocol. Using [<sup>123</sup>I]IPT SPECT imaging, they investigated the association between DAT density, the homozygosity for 10-repeat allele at *DAT1* gene and response to MPH in 11 Korean children with DSM-IV ADHD combined type. All subjects did not have other mental disorders, were MPH-naïve, and were treated with MPH for about 8 weeks at doses up to 0.7 mg/kg/day before the SPECT imaging. ADHD children with 10/10 genotype ( $n=7$ ) had a significantly greater increase of the DAT density in basal ganglia than the children without 10/10 genotype ( $n=4$ ) ( $p < 0.01$ ). In addition, while only 28.6% (2/7) of the subject with 10/10 genotype showed good response (50% decrease in the ADHD RS- IV scores from the baseline) to MPH treatment, 100% (4/4) of the subjects without 10/10 genotype showed good response to MPH treatment ( $p = 0.06$ ). Moreover, ADHD children that showed good response to MPH had significantly lower DAT density in

bilateral basal ganglia areas than those who showed poor response to MPH ( $p < 0.05$ ).

The findings from these two studies fit well with the previous results from both Winsberg and Comings [19] and Roman et al. [20] mentioned above. Taken together, all these findings seem to suggest that, for similar MPH doses, 10/10 homozygous subjects would display less improvement of ADHD symptoms than individuals with other genotypes. Considering that the efficacy of MPH is probably correlated with inhibition of DAT protein, an overactive DAT or augmented density of this protein in synaptic cleft could be present when ten copies of this 40bp sequence exist in the 3'UTR at *DAT1* locus [37]. This would be consistent with the studies of Mill et al. [38], Fuke et al. [39], and Heinz et al. [40] that suggested increased expression of *DAT1* or density of DAT protein when the homozygosity for the 10-repeat allele is present. If this is true, more dopamine transporter (or a more active dopamine transporter) would be available in 10/10 individuals than in subjects without this genotype after the treatment with similar doses of MPH, an excess that would be able to reuptake the extracellular dopamine. In other words, less dopamine would be available in the synaptic cleft when such a higher density of the transporter or an overactive transporter is coded. Since the ultimate effect of MPH is the increase of extracellular dopamine levels, response to this drug in 10/10 individuals would depend on a higher dopaminergic release in brain regions associated to working memory and inhibitory behavior (frontal and basal ganglia areas). This assumption is also in agreement with a recent investigation suggesting

that individual differences in response to methylphenidate are due in part to individual differences in dopamine release (see Volkow et al., 2002) [41].

Loo et al. [42] also presented evidences suggesting that polymorphisms at the *DAT1* might be associated with effects of methylphenidate in the brain. While ADHD children with 9/9 or 9/10 genotypes ( $n = 10$ ) increases  $\theta/\beta$  ratio in EEG activated by Continuous Performance Test with methylphenidate, ADHD subjects with homozygosity for the 10-repeat allele at *DAT1* gene ( $n = 17$ ) presented an opposite pattern with methylphenidate (decrease of the  $\theta/\beta$  ratio). These findings suggest that this polymorphism at the *DAT1* gene mediate medication-related changes in cortical activity among ADHD children.

One area less explored in pharmacogenomic studies is the regulation of neurotransmitter production and turnover at or near the site of drug action. Catechol-O-Methyltransferase (COMT) inactivates catecholamines catalyzing a methyl group transfer from S-adenosylmethionine to the catecholamine neurotransmitters (e.g., dopamine, and norepinephrine). Due to its effects on neurotransmitter metabolism, COMT is a relevant regulator of dopaminergic and noradrenergic neurotransmission. A common genetic polymorphism in humans is associated with a three-to-four-fold variation in COMT enzyme activity and is also associated with individual variation in COMT thermal instability. This is due to a G→A transition at codon 158 of the COMT gene that results in a valine to a methionine substitution [43]. Following positive findings on the association of this

functional polymorphism at codon 158 of the COMT gene and ADHD [44], several other investigations failed to replicate these findings in the disorder [45,46]. Mattay et al. [47] conducted a double-blind, crossover study (amphetamine and placebo) using functional MRI to assess prefrontal cortex function in 25 healthy volunteers who were genotyped for this polymorphism at codon 158 of the *COMT* (9 *val/val*, 10 *val/met*, and 6 *met/met*). Amphetamine enhanced the efficiency of prefrontal cortex function assayed with functional MRI during a working memory task in subjects with the high enzyme activity *val/val* genotype, who presumably have relatively less prefrontal synaptic dopamine, at all levels of task difficulty. In contrast, in subjects with the low activity *met/met* genotype who tend to have superior baseline prefrontal function, the drug had no effect on cortical efficiency at low-to-moderate working memory load and caused deterioration at high working memory load. This findings is also in agreement with a recent study suggesting that MPH might enhance the saliency of tasks that [48].

#### **d) EXPERT OPINION**

Two main key clinical issues that remain to be critically integrated after this review are: 1) How to understand conflicting findings from different studies (e.g., for the polymorphism in the 3' untranslated region at *DAT1*: some studies suggested that the homozygosity for 10-repeat allele is related to poor response to MPH, others did not find any association, and some found completely opposite results; poor response to MPH associated with homozygosity for the 9-repeat allele)? 2) How these research findings might be applied in the clinical environment?

Although the reasons for these discrepancies remain unclear, some possibilities might be addressed: a) differences in the methodology among studies, such as type of patients included (drug-naive patients versus subjects with previous use of methylphenidate; patients with different types of comorbidities) and strategies to assess response to pharmacotherapy (retrospective versus prospective evaluation; use of different scales); b) non replication of positive findings is expected in association studies when samples are not too large [49]; c) the observed effects attributed to the 10-repeat allele at *DAT1* could represent associations with other regions of this gene or with undiscovered markers, in linkage disequilibrium with this 3' UTR polymorphism; d) the effect of different 40bp alleles should not be excluded, as already documented for the 48bp VNTR at the *DRD4* [50]. Recently, two independent groups described different types of the 40bp sequence at the *DAT1* (J. Swanson, personal communication). Therefore, the worse response to methylphenidate associated with the *DAT1* observed in some studies could be due to a particular 10-repeat allele; and e) genetic variability among the assessed populations.

The second clinical question should be addressed in the context of ethical implications in conducting pharmacogenomic studies with ADHD patients [51]. It is important to make clear to patients enrolled in studies that we are far from the moment when genetic screening tests might have a role in determining which patients would be the most suitable for each medication. However, it is well-established that around 30% of the patients with ADHD do not respond satisfactorily or do not tolerate treatment with stimulants [10]. Thus, emerging



findings from pharmacogenomic investigations in ADHD patients might collaborate to identify sub groups of patients that should deserve initial treatment with different medications (e.g., atomoxetine) in the future. In addition, pharmaceutical companies might get insights from these studies for a better understanding of the mechanism of action of drugs used in the disorder facilitating the development of either more specific compounds or drugs that counterbalance the biological effects determined by genes. In this regard, it is fundamental that pharmaceutical industries abandon a short run way of thinking that recommend to avoid funding studies that delimit the scope of patients who might use their products. Up to this moment, governmental agencies should be prepared to fulfill this lacuna in the best interest of the patients, avoiding an unnecessary exposition to medication to some of them in the future.

#### **e) OUTLOOK**

Pharmacogenomic studies of ADHD are in their infancy. What can be expected for the next years in this emerging new are of research? A critical review of the literature on ADHD pharmacogenomics clearly indicates several limitations, such as: 1) the small amount of studies; 2) the complete diverse methodology used in these studies; 3) the preponderance of SNPs association studies, instead of studies involving the assessment of haplotypes or gene to gene interactions; 4) the majority of studies assessing only response to MPH; 5) samples sizes with low power to detect small but significant associations; 6) the complete absence of studies evaluating the correlation between genes and adverse events; 7) the lack

of investigations with other medications than stimulants; 8) the absence of studies evaluating the effects of gene-environment interaction on the response and adverse events of medications used to treat ADHD; 9) the lack of studies investigating the downstream signaling cascade(s) of medications; 10) the absence of pharmacogenomic studies assessing drug metabolism.

To deal with these shortcomings and to cover all these unaddressed issues, we expect for next years that multi-site collaborative efforts to obtain larger samples, as the one currently in development through the ADHD Molecular Genetics Network, should be solidly implemented. Moreover, these studies must apply standardized methodologies to make results comparable. Finally, the field of ADHD pharmacogenomics might benefit from other modern approaches already implemented in molecular genetic studies of ADHD, such as genome-wide scan with huge samples of sib-pairs and investigations of haplotypes instead of individual polymorphisms.

## BIBLIOGRAPHY

Paper of special note have been highlighted as either of interest (\*) or of considerable interest (\*\*) to readers.

1. American Psychiatric Association: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition*. American Psychiatric Association, Washington, DC, 78-85 (1994).
2. Polanczyk G, Lima MS, Horta B, Rohde LA: The worldwide prevalence of ADHD / HKD: What are the real sources of variations in its estimates? A systematic review and meta-regression analysis. Proceedings of the 16<sup>th</sup> World Congress of the International Association for Child and Adolescent Psychiatry and Allied Professions. Berlin, Germany, P019-346 (2004).
3. Faraone SV, Sergeant J, Gillberg C, Biederman J: The worldwide prevalence of ADHD: is it an American condition? *World Psychiatry* 2, 104-113 (2003).
4. Wilens TE, Faraone SV, Biederman J: Attention-deficit/ hyperactivity disorder in adults. *JAMA* 292, 619-623 (2004).
5. Rohde LA, Biederman J, Busnello EA, *et al.*: ADHD in a school sample of Brazilian adolescents: a study of prevalence, comorbid conditions and impairments. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 38, 716-722 (1999).
6. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Diagnosis and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 39, 182-193 (2000).
7. Castellanos FX, Tannock R: Neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorder: the search for endophenotypes. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 617-628 (2002).  
\* Extensively discusses the neurobiology of ADHD.
8. Faraone SV. Genetics of childhood disorders: XX. ADHD, Part 4: Is ADHD genetically heterogeneous? *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 39, 1455-1457 (2000).
9. Kirley A, Hawi Z, Daly G, *et al.*: Dopaminergic system genes in ADHD: toward a biological hypothesis. *Neuropsychopharmacology* 27, 607-619 (2002).
10. Biederman J, Spencer T, Wilens T: Evidence-based pharmacotherapy for attention-deficit hyperactivity disorder. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 7, 77-97 (2004).

11. Faraone SV, Spencer T, Aleardi M, Pagano C, Biederman J: Meta-analysis of the efficacy of methylphenidate for treating adult attention deficit/hyperactivity disorder. *J. Clin. Psychopharmacol.* 24, 24-29 (2004).
  12. Spencer T, Heiligenstein J, Biederman J, *et al.*: Results from 2 proof-of-concept, placebo-controlled studies of atomoxetine in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J. Clin. Psychiatry* 63, 1140-1147 (2002).
  13. Michelson D, Adler L, Spencer T, *et al.*: Atomoxetine in adults with ADHD: two randomized, placebo-controlled studies. *Biol. Psychiatry* 53, 112-120 (2003).
  14. Masellis M, Basile VS, Muglia P, Ozdemir V, Macciardi FM, Kennedy JL: Psychiatric Pharmacogenetics: personalizing psychostimulant therapy in attention deficit/hyperactivity disorder. *Behavioural Brain Research* 130, 85-90 (2002).
  15. Tribut O, Lessard Y, Reymann JM, Allain H, Bentué-Ferrer D: Pharmacogenomics. *Med. Sci. Monit.* 8, 152-163 (2002).
  16. Rohde LA, Roman T, Hutz M: Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: Current aspects on Pharmacogenetics. *Pharmacogenomics J* 3, 11-13 (2003).
  17. Roman T, Rohde LA, Hutz M: Polymorphisms of the Dopamine Transporter Gene: Influence on Response to Methylphenidate in Attention-Deficit/Hyperactivity. *Am. J. Pharmacogenomic* 4, 83-92 (2004).
- \* Reviews in detail all studies assessing effects of individual polymorphisms at *DAT1* on response to MPH in ADHD.
18. Faraone SV, Doyle AE, Mick E, Biederman J: Meta-analysis of the association between the dopamine D4 gene 7-repeated allele and attention-deficit/hyperactive disorder. *Am. J. Psychiatry* 158, 1052-1057 (2001).
  19. Winsberg BG, Comings DE: Association of the Dopamine Transporter Gene (*DAT1*) with poor methylphenidate response. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 38, 1474-1477 (1999).
  20. Roman T, Szobot C, Martins S, Biederman J, Rohde LA, Hutz MH: Dopamine transporter gene and response to methylphenidate in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Pharmacogenetics* 12, 497-499 (2002).
- \*\* Describes an association between the 10-repeat allele at the *DAT1* and response to MPH in a sample of 50 children with ADHD.
21. Hamarman S, Ulger C, Fossella J, Brimacombe M, Dermody J: Influence of dopamine genes on stimulant response in ADHD children. Proceedings of the 50<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry. Miami, USA, 7A (2003).

22. Kirley A, Lowe N, Hawi Z, *et al.*: Association of the 480 bp DAT1 allele with methylphenidate response in a sample of Irish children with ADHD. *Am. J. Med. Genet.* 121B, 50-54 (2003).

23. Stein MA, Sarampote C, Waldman I, *et al.*: Dopamine transporter genotype affects stimulants response according to parent ratings. Proceedings of the 49<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry. San Francisco, USA, 7C (2002).

24. Lott DC, Kim SJ, Cook EH, de Wit H: Dopamine Transporter Gene Associated with Diminished Subjective Response to Amphetamine. *Neuropsychopharmacology* Dec 15 (2004); [Epub ahead of print].

25. Tahir E, Yazgan Y, Cirakoglu B, Ozbay F, Waldman I, Asherson PJ: Association and linkage of DRD4 and DRD5 with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in a sample of Turkish children. *Mol. Psychiatry* 5, 396-404 (2000).

26. Hamarman S, Ulger C, Fossella J, Brimacombe M, Dermody J: Dopamine receptor 4 (DRD4) 7-repeat allele predicts methylphenidate dose response in children with attention deficit hyperactivity disorder: a pharmacogenetics study. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* 14, 564-574 (2004).

\*\* Reports that individuals with the 7-repeat allele at the *DRD4* gene achieved less normalization of symptoms at MPH doses of 50 mg/day and required 1.5 times more MPH to achieve improvement than those without the 7-repeat allele.

27. Park L, Nigg JT, Waldman ID, *et al.*: Association and linkage of alpha-2A adrenergic receptor gene polymorphisms with childhood ADHD. *Mol. Psychiatry* advanced online publication, 2 November (2004); doi:10.1038/sj.mp.4001605.

28. Roman T, Schmitz M, Polanczyk G, Eizirik M, Rohde LA, Hutz M: Further evidence for the association between DBH gene and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Am. J. Med. Genet.* 114, 154-158 (2002).

29. Roman T, Schmitz M, Polanczyk G, Eizirik M, Rohde LA, Hutz M: Association between  $\alpha$ -2a adrenergic receptor gene (*adra2a*) and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Am. J. Med. Genet.* 120B, 116-120 (2003).

30. Yang L, Wang Y, Li J, Faraone S: Association of Norepinephrine Transporter Gene (NET) with Methylphenidate response. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 43, 1154-1158 (2004).

\*\* Describes different responses to MPH in hyperactive-impulsive scores according to *NET1* G1287A genotypes in a sample of 45 Chinese children with ADHD.

31. Swanson JM, Kraemer HC, Hinshaw SP, *et al.*: Clinical relevance of the primary findings of the MTA: success rates based on severity of ADHD and ODD

symptoms at the end of treatment. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 40, 168-179 (2001).

32. Seeger G, Schloss P, Schmidt MH: Marker gene polymorphisms in hyperkinetic disorder--predictors of clinical response to treatment with methylphenidate? *Neurosci. Lett.* 313, 45-48 (2001).

\*\* The only study that assesses gene to gene interaction in the field of ADHD pharmacogenomics.

33. Kent L, Doerry U, Hardy E, *et al.*: Evidence that variation at the serotonin transporter gene influences susceptibility to attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): analysis and pooled analysis. *Mol. Psychiatry* 7, 908-912 (2002).

34. Van der Meulen E, Bakker SC, Pauls DL, Sinke RJ, Buitelaar J: A genome-wide quantitative trait locus analysis on methylphenidate response rate in Dutch sib pairs with Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. Proceedings of the 16<sup>th</sup> World Congress of the International Association for Child and Adolescent Psychiatry and Allied Professions. Berlin, Germany, S-076-351 (2004).

35. Rohde LA, Roman T, Szobot C, Cunha RD, Biederman J, Hutz MH: Dopamine transporter gene, response to methylphenidate and cerebral blood flow in ADHD. *Synapse* 48, 87-89 (2003).

36. Cheon KA, Ryu YH, Kim JW, Cho DY: 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, 95-101 (2005).

\*\* Integrates findings suggesting the association between the 10-repeat allele at the *DAT1* and poor response to MPH in ADHD in a potential more comprehensive explanation of the mechanism of action of MPH.

37. Swanson JM, Flodman P, Kennedy J, *et al.*: Dopamine genes and ADHD. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24, 21-25 (2000).

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

39. Fuke S, Suo S, Takahashi N, Koike H, Sasagawa N, Ishiura S: The VNTR polymorphism of the human dopamine transporter (*DAT1*) gene affects gene expression. *Pharmacogenomics J.* 1, 152-156 (2001).

40. Heinz A, Goldman D, Jones DW, *et al.*: Genotype influences in vivo dopamine transporter availability in human striatum. *Neuropsychopharmacology* 22, 133-139 (2000).

41. Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, *et al.*: Relationship between blockade of dopamine transporters by oral methylphenidate and the increases in extracellular dopamine: therapeutic implications. *Synapse* 43, 181-187 (2002).

42. Loo SK, Specter E, Smolen A, Hopfer C, Teale PD, Reite ML: Functional Effects of the DAT1 Polymorphism on EEG Measures in ADHD. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 42, 986-993 (2003).

43. Lachman HM, Papolos DF, Saito T, Yu YM, Szumlanski CL, Weinshilboum RM: Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics* 6, 243-250 (1996).

44. Eisenberg J, Mei-Tal G, Steinbeg A, *et al.*: 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, 497-502 (1999).

45. Barr CL, Wigg K, Malone M, *et al.*: Linkage study of catechol-O-methyltransferase and attention-deficit hyperactivity disorder. *Am. J. Med. Genet.* 88: 710-713 (1999).

46. Payton A, Holmes J, Barrett JH, *et al.*: 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, 464-470 (2001).

47. Mattay VS, Goldberg TE, Fera F, *et al.*: Catechol O-methyltransferase val<sup>158</sup>-met genotype and individual variation in the brain response to amphetamine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 6186-6191 (2003).

\*\* Documents that amphetamine enhanced the efficiency of prefrontal cortex function assayed with functional MRI during a working memory task in subjects with the high enzyme activity *val/val* genotype, who presumably have relatively less prefrontal synaptic dopamine.

48. Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, *et al.*: Evidence that methylphenidate enhances the saliency of a mathematical task by increasing dopamine in the human brain. *Am. J. Psychiatry* 161, 1173-1180 (2004).

\*\* Provides a new paradigm for the mechanism of action of MPH.

49. Faraone SV, Biederman J, Monuteaux MC: Toward guidelines for pedigree selection in genetic studies of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Genet. Epidemiol.* 18, 1-16 (2000).

50. Lichter JB, Barr CL, Kennedy JL, Van Tol HHM, Kidd KK, Livak KJ: A hypervariable segment in the human dopamine receptor D4 (DRD4) gene. *Hum. Mol. Genet.* 2, 767-773 (1993).
51. Yeh M, Morley KI, Hall WD: The policy and ethical implications of genetic research on attention deficit hyperactivity disorder. *Aust N Z J Psychiatry* 38, 10-19 (2004).



**Table I:** Pharmacogenomic studies on ADHD: Genetic polymorphisms and response to methylphenidate <sup>a</sup>

	<b>Authors</b>				
	<b>Winsberg and Comings [19]</b>	<b>Roman et al. [20]</b>	<b>Hamarman et al. [21,26]</b>	<b>Stein et al. [23]</b>	<b>Kirley et al. [22]</b>
Number of probands	30	50	45	47	119
Age range	6-11	6-17	7-15	5-16	4-25
Ethnicity	African-American	European-Brazilian	African-American (82%) Hispanic (18%)	European-American (90%)	Irish
Diagnosis of ADHD	DSM-III-R	DSM-IV	DSM-IV	DSM-IV	ICD-10/DSM-IV
Impact of comorbidities	Not assessed	Assessed	Cases w/ comorbidities were excluded	Not assessed	Assessed
Design	Naturalistic	Naturalistic	Clinical trial	Clinical trial	Retrospective
Doses	Not less than 40 mg/day for non-responders	Not less than 0.3 mg/kg/day for non-responders	15-60 mg/day	18-54 mg/day	Not informed
Outcome measures	ABRS	ABRS, CGAS	CGI-P	ADHD RS – IV, CGI	3 point parental scale + CPRS-R
Improvement definition	ABRS score equal to or less than 1 in two consecutive assessments during MPH use	Reduction of 50% in ABRS and continuous scores in CGAS	10 point incremental improvement; Normalization (T score $\leq$ 60)	Reliable change index and cutoff score	Categorical rating by parent and continuous scores in the CPRS-R
Main findings	Less improvement for 10/10 genotype at <i>DAT1</i> ; no different responses according to <i>DRD4</i> or <i>DRD2</i> genotypes	Less improvement for 10/10 genotype at <i>DAT1</i>	Lower normalization and higher MPH doses for improvement w/ the 7R allele at <i>DRD4</i> ; no different responses according to <i>DAT1</i> or <i>DBH</i> genotypes	Poor response for 9/9 genotype at <i>DAT1</i>	Higher improvement for 10/10 genotype at <i>DAT1</i>

**Table I:** Pharmacogenomic studies on ADHD: Genetic polymorphisms and response to methylphenidate (continuation) <sup>a</sup>

	Authors	
	Yang et al. [30]	Polanczyk et al. [unpublished]
Number of probands	45	97
Age range	6.5-14	4-17
Ethnicity	Chinese Han	European -Brazilian
Diagnosis of ADHD	DSM-IV	DSM-IV
Impact of comorbidities	Cases with relevant comorbidities were excluded	Assessed
Design	Naturalistic	Naturalistic
Doses	0.45-0.60 mg/kg/day	Not less than 0.3 mg/kg/day
Outcome measures	ADHD RS - IV	SNAP-IV total scores
Improvement definition	continuous scores in the ADHD RS – IV and its subscales	continuous scores in the SNAP-IV total scores
Main findings	Lower changes in the hyperactive – impulsive subscale scores of the ADHD RS – IV for the A/A genotype at the <i>NET1</i> gene	Lower improvement in the SNAP-IV total scores for the m/m genotype at <i>ADRA2A</i>

<sup>a</sup> all patients in the seven studies were treated with methylphenidate, but long-acting preparation was used only in the study of Stein et al.[23]; ABRS: Conners Abbreviated Rating Scale; ADHD: attention-deficit/hyperactivity disorder; ADHD RS-IV: Attention-deficit/hyperactivity disorder rating scale - IV; *ADRA2A*: α2A adrenergic receptor gene; CPRS-R: Conners Parent Rating Scale – revised (long version); CGAS: Children Global Assessment Scale; CGI: Clinical Global Impression; CGI-P: Conners Global Index-Parents; *DAT1*: dopamine transporter gene; *DBH*: dopamine beta-hydroxylase gene; *DRD2*: dopamine D2 receptor gene; *DRD4*: dopamine D4 receptor gene; DSM-III-R: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, third edition revised; DSM-IV: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth edition; ICD-10: International Classification of Disorders, tenth edition; MPH: methylphenidate; *NET1*: noradrenaline transporter gene; SNAP-IV: Swanson, Nolan and Pelham scale – 4<sup>th</sup> version.

**ANEXO 2**

SNAP – IV Escala de pontuação para pais e professores

Nome: .....	Sexo: .....	Idade: .....	Escolaridade: .....
..... Etnia: .....			

Para cada item, escolha a coluna que melhor descreve esta criança:

	<b>NEM UM POUCO</b>	<b>UM POUCO</b>	<b>BASTANTE</b>	<b>DEMAIS</b>
1. Falha em prestar atenção aos detalhes ou comete erros por falta de cuidado em trabalhos escolares e tarefas.				
2. Tem dificuldade em manter atenção em tarefas ou em brincadeiras.				
3. Parece não escutar quando lhe falam diretamente.				
4. Não segue instruções e falha em terminar temas de casa, tarefas ou obrigações.				
5. Tem dificuldade para organizar tarefas e atividades.				
6. Evita, não gosta ou reluta em envolver-se em tarefas que exijam manutenção de esforço mental.				
7. Perde coisas necessárias para suas atividades (brinquedos, livros, lápis, material escolar).				
8. É distraído por estímulos alheios.				
9. É esquecido nas atividades diárias.				
10. Irrequieto com as mãos ou pés ou se remexe na cadeira.				
11. Abandona sua cadeira em sala de aula ou em outras situações nas quais se espera que permaneça sentado.				
12. Corre ou escala em demasia em situações nas quais isto é inapropriado.				
13. Tem dificuldade para brincar ou se envolver silenciosamente em atividades de lazer.				
14. Está a mil ou freqüentemente age como se estivesse a “todo vapor”.				
15. Fala em demasia.				
16. Dá respostas precipitadas antes das perguntas serem completadas.				
17. Tem dificuldade para aguardar sua vez.				
18. Interrompe ou se intromete com os outros (ex: intromete-se em conversas ou brincadeiras).				
19. Descontrola-se.				
20. Discute com adultos.				
21. Ativamente desafia ou se recusa a seguir os pedidos dos adultos ou as regras.				
22. Faz coisas que incomodam os outros de propósito.				
23. Culpa os outros pelos seus erros ou má conduta.				
24. É sensível ou facilmente incomodado pelos outros.				
25. É raivoso ou ressentido.				
26. É malvado ou vingativo.				

## ANEXO 3

**ESCALA DE AVALIAÇÃO GLOBAL DE CRIANÇAS**  
**CHILDREN'S GLOBAL ASSESSMENT SCALE -**  
**CGAS**

Pontue o nível de maior limitação da criança em seu funcionamento geral para o período de tempo especificado selecionando o nível mais baixo que descreva seu funcionamento em um *continuum* hipotético de saúde-doença. Use níveis intermediários (p.ex., 35, 58, 62). Pontue o funcionamento real independente do tratamento ou prognóstico. Os exemplos de comportamentos fornecidos são somente ilustrativos e não são necessários para uma pontuação particular.

- 100 - 91 Funcionamento superior em todas as áreas (em casa, na escola e com os pares); envolvido numa ampla gama de atividades e tem muitos interesses (p.ex., tem *hobbies* ou participa em atividades extracurriculares ou pertence a um grupo organizado, como time de futebol, escotismo, entre outros); amável, seguro, as preocupações do dia-a-dia nunca saem de seu controle; vai bem na escola; sem sintomas.
- 90 - 81 Bom funcionamento em todas as áreas; sente-se seguro em família, na escola e com os pares; pode haver dificuldades passageiras, e, ocasionalmente, as preocupações do dia-a-dia saem de seu controle; (p.ex., ansiedade discreta associada com um exame importante, acessos de raiva ocasionais com irmãos, pais ou com os pares).
- 80 - 71 Não mais que uma limitação leve no funcionamento em casa, na escola ou com os pares; algum distúrbio no comportamento ou desconforto emocional pode estar presente em resposta a situações de estresse na vida (separação dos pais, falecimento, nascimento de um irmão), mas são breves, e a interferência no funcionamento é passageira; outras crianças são só, minimamente, perturbadas por tais crianças e não são consideradas desviantes por aqueles que as conhecem.
- 70 - 61 Alguma dificuldade em uma única área, mas, em geral, funciona relativamente bem (p.ex., atos antisociais isolados ou esporádicos tais como: ocasionalmente cabulalmata aula ou comete furto insignificante; dificuldades menores persistentes no trabalho escolar; alterações no humor, de curta duração; medos e ansiedades que não conduzem a um sério comportamento de evitação; inseguro); tem algumas relações interpessoais importantes; a maioria das pessoas que não conhece bem a criança não a considerariam desviante mas aqueles que a conhecem bem poderiam expressar preocupação.
- 60 - 51 Funcionamento variável com dificuldades esporádicas ou sintomas em várias, mas não em todas áreas sociais; o problema seria aparente para aqueles que encontram a criança em uma situação disfuncional no momento mas não para aqueles que vêem a criança em outras situações.
- 50 - 41 Grau moderado de interferência no funcionamento na maioria das áreas sociais, limitação grave do funcionamento em uma área, que pode resultar, por exemplo, de preocupações e ruminções suicidas, recusa escolar e outras formas de ansiedade, rituais obsessivos, sintomas importantes de conversão, crises freqüentes de ansiedade, habilidades sociais pobres ou inapropriadas, episódios freqüentes de comportamento agressivo ou outros comportamentos anti-sociais com alguma preservação das relações sociais significativas.
- 40 - 31 Limitação importante no funcionamento em várias áreas e incapaz de funcionar em uma dessas áreas, ou seja, perturbado em casa, na escola, com os pares ou na sociedade de modo geral, p. ex., agressão constante sem uma provocação evidente; comportamento isolado e retraimento acentuado, por distúrbio do humor ou do pensamento, tentativas de suicídio com intenção claramente letal; tais crianças provavelmente requerem escola especial e/ou hospitalização ou retirada da escola (mas isto não é um critério suficiente para a inclusão nesta categoria).
- 30 - 21 Incapaz de funcionar em quase todas as áreas, p. ex., permanece em casa, na enfermaria ou na cama o dia todo sem tomar parte nas atividades sociais ou grave limitação na noção de realidade ou séria limitação na comunicação (p.ex., às vezes inapropriada ou incoerente).
- 20 - 11 Necessita considerável supervisão para prevenir que machuque a si mesmo ou a outros (p.ex., é violento com freqüência, faz tentativas repetidas de suicídio) ou para manter a higiene pessoal, ou grave limitação em todas formas de comunicação, p. ex., anormalidades graves na comunicação verbal ou gestual, alheamento social acentuado, estupor, etc.
- 10 - 1 Necessita supervisão constante (24 hs de cuidado) devido a comportamento agressivo grave ou autodestrutivo ou grande limitação no teste de realidade, comunicação, cognição, afeto ou higiene pessoal.

## ANEXO 4

## **ESCALA DE AVALIAÇÃO DE EFEITOS COLATERAIS DE MEDICAÇÕES ESTIMULANTES**

Por favor, pontue cada comportamento de 0 (ausente) até 9 (grave). Circule somente um número ao lado de cada item. 0 significa que você não tem visto o comportamento nesta criança durante a última semana e 9 significa que você tem notado o comportamento e acredita que ele seja muito grave ou que ocorra muito freqüentemente.

<b>Comportamento</b>	<b>Ausente</b>										<b>Severo</b>
Insônia ou problemas no sono	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Pesadelos	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Fica com olhar perdido ou sonha acordado	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Fala menos com os outros	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Desinteressado nos outros	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Apetite diminuído	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Irritável	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Dor de estômago	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Dor de cabeça	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Sonolência	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Triste / infeliz	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Chora fácil	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Ansioso	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Roe as unhas	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Eufórico / feliz fora do comum	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Tontura	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Tiques ou movimentos nervosos	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	

**ANEXO 5****TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO****ESTUDO DO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E  
HIPERATIVIDADE – SUSCETIBILIDADE GENÉTICA E  
IDENTIFICAÇÃO DE GENES CANDIDATOS**

Antes de sua participação neste estudo, é preciso esclarecer alguns detalhes importantes, para que possíveis dúvidas sejam resolvidas. Em caso de qualquer outra dúvida quanto à pesquisa ou sobre os seus direitos, vocês poderão contatar os responsáveis pelo estudo: Tatiana Roman, bióloga, Doutora em Genética e Biologia Molecular, pelo telefone (51) 3311-2406 ou o Dr. Luis Augusto Rohde, professor de psiquiatria, pelo telefone (51) 2101 8294.

*Qual o objetivo desta pesquisa?*

O objetivo do nosso estudo é conhecer um pouco mais sobre algumas das causas do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH). Pretendemos esclarecer a possível contribuição genética no TDAH e a possibilidade de que alguns genes estejam associados a resposta ao tratamento. Para este fim, as crianças e os pais vão ser avaliados através de uma análise de DNA.

*Como é feita esta análise do DNA?*

Será coletada de cada indivíduo uma amostra de 5ml de sangue, através de punção venosa, usando-se agulhas e seringas descartáveis. Esta coleta será feita por um indivíduo treinado. De cada amostra de sangue será extraído o DNA, em laboratório. Com o DNA teremos acesso à informação genética que pode estar relacionada com a doença, conforme explicado no item anterior. As amostras são identificadas por números, diferentes daqueles utilizados pelo Hospital. A quantidade de sangue coletada será suficiente para se extrair o DNA necessário ao estudo, que

será completamente utilizado durante o mesmo. Após a investigação, o DNA não ficará armazenado, sendo desprezadas possíveis sobras deste material.

*Quais os riscos em participar?*

Poderá haver a formação de um pequeno hematoma local em função da coleta de sangue. Além deste, não há qualquer outro risco, nem para o paciente, nem para os pais, em participar deste projeto.

*O que a família ganha com este estudo?*

Este estudo poderá trazer vários benefícios, mesmo que a longo prazo. Com a análise do DNA, poderemos saber se diferentes genes atuam como fatores causadores da doença, e se estes genes influenciam na resposta ao tratamento medicamentoso, como estamos supondo. Tendo-se observado isto, poderemos determinar com mais precisão que mecanismos biológicos estão envolvidos, e quais os medicamentos mais adequados, o que facilitará a escolha do tratamento, e o tornará mais eficiente. Além disso, havendo determinantes genéticos, estes poderão ser observados precocemente, o que contribuirá para estratégias de prevenção. Por fim, a sua participação ajudará no desenvolvimento de novos conhecimentos, que poderão eventualmente beneficiar vocês e outras pessoas que enfrentam o mesmo problema.

*Quais são os seus direitos?*

Os seus registros médicos serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados deste estudo poderão ser usados para fins científicos, mas vocês não serão identificados por nomes.

Sua participação no estudo é voluntária, de forma que, caso vocês decidam não participar, isto não afetará o tratamento normal a que a criança tem direito.

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PACIENTES  
ACORDO EM PARTICIPAR DE UM ESTUDO EM GENÉTICA

Número do Estudo: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Cód. de Ident. do Indivíduo:

Nome do Indivíduo:  
\_\_\_\_\_

Data de Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome do Pai: \_\_\_\_\_

Nome da Mãe: \_\_\_\_\_

Médico Supervisor: \_\_\_\_\_

Assinatura do paciente:

Assinatura do Pai:

Assinatura da Mãe:

Assinatura do Médico Supervisor:

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_