

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**INVESTIGAÇÃO DO POLIMORFISMO -75T>G DO GENE *CES1* EM CRIANÇAS
COM TDAH E SUA INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO DE REDUÇÃO DE
APETITE DEVIDO AO TRATAMENTO COM METILFENIDATO**

Estela Maria Bruxel

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular

Orientadora: Prof. Dra. Mara Helena Hutz

Porto Alegre, Março de 2012

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Humana Molecular do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e foi subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil), Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP)

Dedico às crianças que participaram desse trabalho. Espero que um dia elas possam desfrutar dos resultados aqui obtidos para terem melhor qualidade vida

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à Mara, por ter me acolhido tão bem, ter confiado na minha capacidade de realizar esse trabalho e sempre estar à disposição para esclarecer, ensinar e chamar a atenção nos momentos precisos.

À minha família por sempre estarem do meu lado, pelo apoio nas minhas decisões. Agradeço à mãe, um porto seguro, minha maior incentivadora, a quem recorri nos momentos de dúvidas e compartilhei todas as minhas alegrias, sempre tem uma palavra sábia para dar. Pai, apesar de não saber ao certo o que faço, sempre acreditou no meu potencial, me esperou carinhosamente com o chimarrão na frente de casa quando eu voltava pra Venâncio e, infelizmente, não pôde ver essa etapa concluída. Às minhas irmãs, Daniela e Juliana pelo companheirismo, amor e amizade. Ao meu afilhado Felipe, por ser minha alegria nas horas de descontração.

Ao meu amor Tuta, por estar ao meu lado em todas as situações. Suportar meu mau-humor e me fazer rir nos momentos inesperadamente certos. Demonstrar seu amor e carinho nos pequenos gestos do dia-a-dia.

Gostaria de agradecer ao pessoal do departamento: Luciana Tovo, Vinícius, Mari Rieck, Angélica, Diego, Guilherme, Evelise, Deise, Luciana Lima, Juliana, Mari Botton por terem compartilhado uma boa parte do conhecimento que adquiri, pelas ajudas e esclarecimentos de dúvidas, pelas conversas, risadas e bons momentos que fizeram esses dois anos passarem tão rápidos. Um agradecimento especial para Angélica, por ter sido muito importante nesse estudo, pela ajuda com as análises estatísticas, e teve paciência por tantas vezes interrompê-la e se dedicar a pensar e encontrar explicações para as variáveis utilizadas ou resultados encontrados. Além disso, uma grande amiga em qualquer situação, sempre com uma palavra de incentivo e sua amizade.

À Flavia que sempre foi compreensiva na minha ausência, mas sempre está ao meu lado.

Aos professores da Pós-Graduação por ter contribuído com o conhecimento adquirido nesses dois anos.

Ao Elmo por estar sempre com um sorriso no rosto e disposto a ajudar.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
RESUMO.....	7
ABSTRACT	9
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	11
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	12
1.2 ETIOLOGIA	13
1.3 FISIOPATOLOGIA	14
1.4 FARMACOLOGIA	17
1.4.1 Efeitos Adversos	19
1.4.2 Farmacogenética e o TDAH	21
1.5 CARBOXILESTERASES.....	25
1.5.1 Classificação e nomenclatura das CES.....	25
1.5.2 Localização	27
1.5.3 Estrutura.....	27
1.5.4 CES1 e a especificidade ao metilfenidato.....	28
1.5.5 Variabilidade genética em CES1	30
CAPÍTULO II - JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS	33
CAPÍTULO III - Association of a Carboxylesterase 1 polymorphism with appetite reduction in children and adolescents with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder treated with methylphenidate.....	35
CAPÍTULO IV - DISCUSSÃO.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE ABREVIATURAS

TDAH (ADHD) – Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (*Attention Deficit/Hyperactivity Disorder*)

MFD (MPH) – Metilfenidato (*methylphenidate*)

CES – Carboxilesterase

DSM-IV – Manual diagnóstico e estatístico de doenças mentais, versão IV

DAT – Transportador de dopamina

DAT1 – Gene do transportador de dopamina

CES1 – Carboxilesterase 1

d-MFD – *dextro*-metilfenidato

l-MFD – *levo*-metilfenidato

5'UTR – Região 5' não traduzida

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismo de Nucleotídeo Único)

pb – pares de bases

kb – kilo bases (mil pares de bases)

CPT-11 – irinotecano

C/EBP – CCAAT/*enhancer binding protein*

MAO-A – Monoamino oxidase-A

HTR1B – Receptor de serotonina 1B

HTR2A – Receptor de serotonina 2A

5-HTT – Transportador de serotonina

DRD4 – Receptor de dopamina tipo D4

ADRA2A – Receptor adrenérgico α -2A

COMT – Catecol-O-metiltransferase

SNAP 25 – Proteína 25 associada à sinaptossoma

BSSERS – Barkley Stimulant Side Effect Rating Scale

RESUMO

O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) está entre as doenças psiquiátricas mais comuns na infância e adolescência. O TDAH é uma doença bastante heterogênea caracterizada por sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade, determinando prejuízo significativo na qualidade de vida dos pacientes. O metilfenidato (MFD) é o fármaco estimulante mais utilizado e o único disponível no Brasil para o tratamento do TDAH, possuindo grande efetividade no tratamento dos sintomas. Embora os efeitos adversos do metilfenidato não sejam graves, eles podem ter impacto em curto e em longo prazo nos domínios do funcionamento. O efeito adverso mais relatado durante o tratamento é a redução de apetite com perda de peso. O gene CES1 codifica a enzima responsável pela hidrólise do MFD ao metabólito inativo ácido ritalínico antes de entrar na corrente sanguínea. Apesar de vários estudos farmacogenéticos do TDAH já terem sido publicados, pouca atenção foi dedicada à variabilidade da farmacocinética do MFD. O objetivo deste estudo foi avaliar a associação entre o polimorfismo -75T>G (rs3815583) no gene CES1 e a redução de apetite em crianças com TDAH.

Um total de 213 crianças com TDAH preencheram os critérios de inclusão para participar do estudo. O diagnóstico de TDAH e suas comorbidades foram realizados através de três estágios, previamente descritos na literatura. As dosagens de metilfenidato foram aumentadas até não haver mais melhora clínica ou até existirem efeitos adversos significativos (doses acima de 0,3 mg/kg/dia). A medida dos efeitos adversos foi baseada na Barkley Stimulant Side Effect Rating Scale (BSSERS) e aplicada por psiquiatras, sem o conhecimento prévio dos genótipos, antes do tratamento, no primeiro e terceiro mês de tratamento.

Uma piora significativa nos escores redução do apetite desde o início até o primeiro e terceiro mês de tratamento [$n = 205$; $F(2,270) = 82,07$, $p < 0,001$] foram observados. O alelo G foi significativamente associado com redução do apetite durante o tratamento [$F(1,197) = 4,04$, $p = 0,046$]. Uma interação significativa entre o alelo G e o tempo de tratamento também foi observada [$F(2,265) = 3,71$, $p = 0,026$]. Portadores do alelo G apresentavam 3,5 vezes o risco de maiores escores de redução do apetite comparados com indivíduos homocigotos para o alelo T (OR = 3,47, 95% (CI) = 1,38-8,77, $p = 0,009$).

Os resultados sugerem uma influência do polimorfismo -75 T> G do gene CES1 na piora da redução de apetite durante o tratamento com MFD em crianças com TDAH. Este é o primeiro estudo farmacogenético de uma associação de efeitos adversos ao MFD com um gene envolvido na farmacocinética deste fármaco, portanto, a replicação é necessária.

ABSTRACT

Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is one of the most prevalent psychiatry disorders in childhood and adolescence, affecting 5.3% of children worldwide. ADHD is a very heterogeneous disorder characterized by symptoms of inattention, hyperactivity and impulsivity determining significant impairment across the life cycle. Methylphenidate (MPH) is the most widely and the only prescribed stimulant drug for ADHD treatment in Brazil, and it has great effectiveness on the treatment for ADHD symptoms. Although adverse effects of methylphenidate are mild, they can have an impact on the short and long term domains of functioning. The most frequently reported adverse effect during treatment is appetite reduction with weight loss. The CES1 gene encodes the enzyme responsible for hydrolysis of the inactive metabolite MPH to ritalin acid before entering the systemic circulation. Although several ADHD pharmacogenetic studies have been published, little attention has been paid to the genetic variability associated with MPH pharmacokinetics. The aim of the present study was to evaluate the association between the -75 T>G (rs3815583) polymorphism CES1 and appetite reduction in children with ADHD.

A total of 213 children with ADHD fulfilled inclusion criteria to participate in the study. A consensus diagnosis of ADHD with or without comorbidity was achieved through a three-stage process, as previously described in the literature. Dosages of short-acting MPH were augmented until no further clinical improvement was detected or until there were significant adverse events (MPH dose always > 0.3 mg/kg/day). The primary outcome measured was the parent-rated Barkley Stimulant Side Effect Rating Scale (BSSERS). The scale was applied by child psychiatrists blinded to genotype at baseline and at 1 and 3 months of treatment. A significant worsening in appetite reduction scores from baseline to the first and three months of treatment [$n = 205$; $F(2,270) = 82.07$, $p < .001$] were observed. The G allele was significantly associated with appetite reduction scores during treatment [$F(1,197) = 4.04$, $p = .046$]. A significant interaction between the G allele and treatment over time for appetite reduction scores was also observed [$F(2,265) = 3.71$, $p = .026$]. G allele carriers presented 3.5 times the risk to develop the highest scores of appetite reduction when compared with subjects homozygous for the T allele (OR=3.47, 95% (CI) = 1.38 - 8.77, $p = .009$).

The present results suggest an influence of the CES1 -75 T>G on appetite reduction worsening of with MPH treatment in children with ADHD. This is the first pharmacogenetic report of an association of MPH side effects with a gene involved in the pharmacokinetics of this drug, therefore replication is warranted.

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) é uma doença psiquiátrica comum que atinge cerca de 5% de crianças e adolescentes em idade escolar ao redor do mundo (Polanczyk *et al.* 2007a). Essa frequência diminui com a idade, mas na vida adulta a incidência é de 2,5% a 4,4% (Fayyad *et al.*, 2007). Esse transtorno é caracterizado por desenvolvimento inapropriado e níveis prejudiciais de desatenção, hiperatividade e impulsividade de acordo com DSM-IV, onde são subdivididos em dois grupos comportamentais: desatenção e hiperatividade/impulsividade (American Psychiatric Association, 2004). Para o diagnóstico de TDAH, a criança deve apresentar pelo menos seis sintomas de desatenção e/ou seis sintomas de hiperatividade/impulsividade no mínimo por 6 meses, com caracterização de prejuízo em função destes sintomas em mais de um ambiente (por exemplo: casa e escola) e início do prejuízo antes dos sete anos. Com base nesses sintomas, três subtipos clínicos de TDAH podem ser reconhecidos: predominantemente desatento; predominantemente hiperativo/impulsivo e subtipo combinado. Esses sintomas são de grande impacto na sociedade, pois afetam o desempenho acadêmico, as relações familiares e o ajustamento social dos indivíduos. Socialmente, crianças que têm o subtipo de desatenção são menos agressivas e têm menos comorbidades como o transtorno opositor-desafiante ou transtorno de conduta, quando comparadas com as que têm o subtipo hiperativo/impulsivo ou os sintomas combinados (Maedgen e Carlson, 2000, Eiraldi *et al.*, 1997). As crianças classificadas como predominantemente desatentas e do subtipo combinado parecem apresentar uma taxa mais elevada de prejuízo acadêmico. Os sintomas de conduta e oposição/desafiante ocorrem mais frequentemente em crianças com qualquer um dos tipos de TDAH do que em crianças normais (Rohde *et al.*, 2000).

A taxa de meninos com TDAH é três vezes maior que em meninas segundo estudos clínicos (Rohde *et al.*, 1999; Biederman and Faraone, 2005), enquanto que estudos epidemiológicos relatam uma taxa de 2:1 (Arcia and Conners, 1998). Parte

dessa diferença possivelmente é determinada por um viés devido aos sintomas de comportamento disruptivo, no qual meninos têm mais sintomas de hiperatividade/impulsividade e oposição do que meninas (Abikoff *et al.*, 2002; Biederman *et al.*, 2002). No entanto, há também uma escassez de pesquisas em pacientes femininos com TDAH. Resultados conflitantes quanto ao dimorfismo sexual nessa patologia são relatados na literatura (Berry *et al.*, 1985; Horn *et al.*, 1989; Breen and Altepeter; 1990; Faraone *et al.*, 1991). Mas, considerando a alta herdabilidade do TDAH (Biederman and Faraone, 2005), é possível que diferentes vias genéticas determinem expressão diferenciada dos sintomas de TDAH e bem como de características associadas por gênero (Bierdeman *et al.*, 2008). Aproximadamente 65% das crianças com diagnóstico de TDAH continuam apresentando os sintomas na vida adulta, demonstrando que é um transtorno do desenvolvimento crônico (Barkley, 2002), mas a diferença de taxas entre os gêneros diminui e a distribuição tende a ser mais similar.

1.2 ETIOLOGIA

O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade é uma desordem heterogênea e complexa. Há evidências que fatores ambientais tenham um papel importante na sua etiologia (Banerjee *et al.*, 2007); mas também existem fortes indícios que apóiam a contribuição genética no desenvolvimento do transtorno. Dentre as contribuições ambientais, os fatores psicossociais que atuam no funcionamento adaptativo e na saúde emocional da criança, tais como desentendimentos familiares e presença de transtornos mentais nos pais parecem ter um papel importante no surgimento e na manutenção da doença (Faraone and Biederman 1998). Discórdia marital grave, classe social baixa, família muito numerosa, criminalidade dos pais, psicopatologia materna e colocação em lar adotivo, foram algumas das adversidades sociais já associadas com o TDAH (Biederman *et al.*, 1995). Estudos que focam a associação entre TDAH e complicações na gestação ou no parto apóiam a idéia que problemas como

eclâmpsia, duração do parto, estresse fetal, baixo peso ao nascer, má saúde materna, uso de álcool e nicotina pela mãe, predisponham ao TDAH (Faraone and Biederman, 1998; Mick *et al.*, 2002). Em 2005, Faraone *et al.* demonstraram a alta herdabilidade do TDAH através de uma revisão, onde descrevem vários estudos relatando uma elevada prevalência do transtorno entre membros de uma mesma família. O risco aumenta de duas a oito vezes entre pais e irmãos de crianças com TDAH. Estudos de adoção mostram que pais biológicos de crianças com TDAH têm prevalência três vezes maior da doença quando comparados aos pais adotivos. Em mais de 20 estudos com gêmeos dos Estados Unidos, da Austrália, da Escandinávia e da União Européia, a herdabilidade foi estimada em média em 76% (Faraone *et al.*, 2005).

Dentre os diversos estudos já realizados para entender o padrão de herança da doença nas famílias, o mais aceito atualmente, é que a transmissão do TDAH ocorre através de vários genes de pequeno efeito, que interagem entre si e com o ambiente, conferindo suscetibilidade ao transtorno (Nigg and Goldsmith, 1998; Thapar *et al.*, 1999). Os fatores genéticos que influenciam a origem do TDAH podem ser diferentes daqueles que atuam ao longo dos estágios de desenvolvimento do indivíduo, por exemplo, os genes que contribuem para o TDAH na infância podem não ser os mesmos para os casos em adultos. E ainda estes componentes genéticos podem ser distintos no que se refere ao curso, desfecho e presença de comorbidades (Thapar *et al.*, 2007). Entretanto, ainda é uma incógnita como esses fatores ambientais e genéticos influenciam o cérebro e conseqüentemente o comportamento dos indivíduos afetados.

1.3 FISIOPATOLOGIA

Várias teorias foram formuladas para explicar a fisiopatologia do TDAH. Há relatos de que em testes neuropsicológicos, crianças portadoras de TDAH, apresentavam desempenho prejudicado nas tarefas que exigiam funções cognitivas

como atenção, percepção, organização e planejamento, pois tais processos se encontram relacionados com o lobo frontal e áreas subcorticais (Swanson *et al.*, 1998b). Barkley (1997) sugeriu uma teoria neuropsicológica na qual a inibição comportamental seria o principal déficit do TDAH, com distúrbios em cinco domínios neuropsicológicos. Esses padrões eram similares aos observados em adultos com dano no lobo pré-frontal, sugerindo que o córtex frontal ou regiões projetadas a ele não estão funcionais em crianças com TDAH. Wender *et al.* (1971) propuseram que os sintomas do transtorno seriam causados por anormalidade nos sistemas da dopamina (DA) e da noradrenalina (NA), sendo que a medicação estimulante usada para tratar os sintomas atua nesses neurotransmissores para compensar o déficit. Evidências neuroanatômicas sugeriram que os sintomas do TDAH poderiam ser causados por disfunções fronto-límbicas, onde um fraco controle inibitório frontal cortical sobre as funções límbicas poderiam levar ao TDAH (Satterfield and Dawson, 1971). Recentemente, o sistema serotoninérgico também foi implicado na etiologia do transtorno. A serotonina (5-HTT) está envolvida na regulação de uma ampla gama de funções psicológicas, comportamentais e biológicas que, quando desreguladas, influenciam o desenvolvimento e evolução de um conjunto também amplo de transtornos psiquiátricos e médicos (Lucki, 1998). O papel do sistema serotoninérgico no TDAH é também apoiado por um estudo mostrando que os níveis de 5-HTT nas plaquetas foram relativamente mais baixos em um grupo de crianças TDAH grave (Spivak *et al.*, 1999).

O sistema dopaminérgico tem sido o maior foco de estudos para explicar o TDAH. No cérebro há quatro vias dopaminérgicas bem definidas: a nigroestriatal que é parte do sistema extrapiramidal e controla os movimentos; a mesolímbica que, se projetando para o *nucleus accumbens*, se relaciona com o comportamento e a sensação de prazer; a via mesocortical, que ao se projetar na área tegmental ventral do mesencéfalo, atinge o córtex límbico onde atua sobre a função cognitiva e no controle motor frontal e a tuberoinfundibular que na hipófise controla a secreção de prolactina (Van der Kooij and Glennon, 2007). As vias dopaminérgicas mesocortical e nigroestriatal estariam implicadas no TDAH; uma hipofunção nas áreas corticais seria responsável por déficits cognitivo e das funções executivas, ou seja, conjunto

de funções responsáveis pelo início e desenvolvimento de uma atividade com objetivo final determinado (Davids *et al.*, 2003; Cardinal *et al.*, 2004). De outra parte, uma hiperfunção dopaminérgica no núcleo estriado resultaria nos sintomas de hiperatividade e impulsividade. (Kadesjo e Gillberg, 1999). Assim, a hipótese dopaminérgica inicial de que diferentes anormalidades neste sistema explicariam os sintomas orientou um grande número de estudos neurobiológicos e genéticos, que em muito ampliaram o conhecimento sobre o TDAH.

No cérebro, os receptores que modulam os efeitos fisiológicos da dopamina (DA) pertencem à família de receptores acoplados a proteína G. Há dois grupos de receptores: os receptores dopaminérgicos do Tipo D1 (compreende os receptores D1 e D5) que estimulam a adenilato ciclase e os receptores dopaminérgicos do tipo D2 (compreende os receptores D2, D3 e D4) que inibem a adenilato ciclase. Todos os subtipos de receptores são expressos no cérebro em áreas distintas, mas sobrepostas; os receptores D1 são mais abundantes e espalhados em áreas que recebem inervações dopaminérgicas (estriado, sistema límbico, tálamo e hipotálamo); D3 e D4 estão presentes no estriado e no sistema límbico e, receptores D2 estão espalhados nessas áreas e também na glândula pituitária. Estudos com animais mostraram que a falta do transportador e dos receptores D1 e D3 de dopamina aumentam a atividade motora, enquanto que a falta dos receptores D2 e D4 reduzem esta atividade (Swanson *et al.*, 1998a). O responsável por reciclar o neurotransmissor é o transportador de DA (DAT). O DAT é uma proteína carregadora de soluto que recapta a dopamina da fenda sináptica para o neurônio pré-sináptico. Essa proteína é expressa em todos os neurônios dopaminérgicos, mas a concentração de DA, DAT e densidade de receptores não é a mesma em todo o cérebro.

Estudos de neuroimagem são bastante utilizados para compreender a neurobiologia do TDAH. Embora existam limitações consideráveis na técnica, estes estudos mostram-se bastante adequados para este fim, seja através de estudos estruturais com ressonância magnética (MRI) e tomografia computadorizada, e/ou estudos funcionais com ressonância magnética funcional (fMRI), tomografia por emissão de pósitrons (PET) e tomografia por emissão de fótons únicos (SPECT).

Castellanos *et al.* (2002) analisaram 152 crianças e adolescentes com TDAH e 139 crianças sem o transtorno. Os pacientes tiveram volumes cerebrais significativamente menores do que os controles, apresentando menor volume total (-3,2%) e menor volume cerebelar (-3,5%). As anormalidades volumétricas do cérebro persistiram durante o desenvolvimento e se mantiveram durante a adolescência, nos dando indícios que as trajetórias de desenvolvimento permanecem paralelamente desiguais entre pacientes e controles durante a infância e adolescência. Segundo a revisão de Solanto (2002), os estudos de neuroimagem convergem seus resultados, revelando que crianças com TDAH apresentam um volume cerebral, em média 4% menor quando comparadas com crianças normais.

Modelos animais demonstram ter várias vantagens sobre os casos clínicos: os resultados podem ser facilmente interpretados porque os grupos são geneticamente mais homogêneos, o ambiente pode ser controlado e uma variedade de intervenções é possível. Embora esses modelos possam ser úteis para investigar a etiologia do TDAH, eles não podem ser considerados como substitutos para estudos da doença em humanos. Van der Kooij e Glennon (2007) descreveram e compararam 14 modelos animais de TDAH, demonstrando algum tipo de disfunção de DA. Genro *et al.* (2010) mostraram em uma revisão, evidências de modelos animais, farmacologia, neuroimagens e estudos genéticos que apóiam a idéia de que o transtorno de déficit de atenção/hiperatividade é uma doença do sistema dopaminérgico.

1.4 FARMACOLOGIA

Por mais de 60 anos, o principal tratamento para o TDAH é a utilização de estimulantes que aumentam a neurotransmissão de DA e NA, como o metilfenidato e anfetaminas (Spencer, 2004). Fármacos não-estimulantes como a atomoxetina que é um potente inibidor do transportador pré-sináptico de NA, com pouca afinidade para outros receptores noradrenérgicos, também são indicados para o tratamento de

TDAH em crianças, adolescentes e adultos. O metilfenidato (MFD) é o estimulante mais utilizado no Brasil, possui grande efetividade no tratamento dos sintomas, reduzindo cerca de 50% dos mesmos em aproximadamente 70% de crianças de modo satisfatório. O fármaco aumenta os níveis de dopamina na fenda sináptica pela inibição das funções de DAT (Galtey *et al.*, 1996; Volkow *et al.*, 2001). A efetividade do fármaco é mais uma evidência da hipótese dopaminérgica para a fisiopatologia da doença. No entanto, diferenças importantes foram observadas em resposta à medicação de acordo com o subtipo de TDAH e comorbidades associadas. Por exemplo, pacientes com o subtipo predominantemente hiperativo-impulsivo, bem como pacientes com comorbidades como o transtorno de conduta ou transtorno opositor/desafiante têm uma maior taxa de sucesso do tratamento em relação aos pacientes com o tipo desatento ou ansioso. Em outro caso, mais de 80% de crianças com TDAH e não ansiosos responderam ao tratamento, ao passo que apenas 30% das crianças com TDAH e ansiedade se beneficiaram do medicamento (Pliszka, 1989). Além disso, pacientes com TDAH e ansiedade tem efeitos colaterais mais nocivos do que os pacientes com TDAH isolado. Para as crianças com TDAH e ansiedade, o tratamento psicológico em associação com os estimulantes demonstrou ser o tratamento ideal (Jesen *et al.*, 1999).

As propriedades farmacocinéticas e o mecanismo molecular de ação do MFD têm sido extensivamente estudados. O metilfenidato tem dois centros quirais, assim, há quatro isômeros: um par *d, l*-erythro-metilfenidato e um par *d, l*-threo-metilfenidato. Somente a mistura racêmica do par threo de enantiômeros é utilizada terapêuticamente, o *d*-MFD é considerado o isômero ativo, pois desenvolve menos efeitos adversos que o par erythro (Markowitz *et al.*, 2003). A via do metabolismo primário ocorre através da deesterificação dos dois isômeros para metabólitos inativos como o ácido ritalínico. Esse processo, mediado pela carboxilesterase 1 (CES1), é estereoseletivo e favorece fortemente a hidrólise do isômero *l*-metilfenidato (Sun *et al.*, 2004). Estudos farmacocinéticos do metilfenidato racêmico, no qual são empregados métodos analíticos enantioseletivos, demonstraram que o *l*-isômero é responsável por uma pequena fração da concentração do metilfenidato na circulação sanguínea com o predomínio do *d*-isômero circulando (Patrick *et al.*, 1987, Sun *et*

al., 2004). Uma dose de 5 mg de *d*-threo-MFD tem o mesmo efeito na melhora da atenção que uma dose de 10 mg de *d,l*-threo-MFD. Portanto, o efeito clínico do metilfenidato é atribuído ao *d*-isômero (Srinivas *et al.*, 1992b). Depois da administração oral, as concentrações plasmáticas de *d*-MFD são imediatamente maiores que a do outro isômero em trinta minutos após a ingestão. Na administração intravenosa, somente uma hora e meia após a aplicação da dose é que se observam diferenças significantes entre os isômeros. Altas concentrações de *l*-ácido ritalínico tanto no plasma quanto na urina humana são encontradas nas primeiras duas horas de administração oral, mas não intravenosa (Srinivas *et al.*, 1990, 1992a). Além disso, a meia-vida plasmática de *d*-MFD é maior que o *l*-MFD. Em um estudo enantioespecífico de metilfenidato administrado intravenosamente, ambos os isômeros exibiam características similares de distribuição, embora a fase de eliminação terminal do *l*-isômero fosse mais rápida (Markowitz and Patrick, 2008).

1.4.1 Efeitos Adversos

Os efeitos adversos do metilfenidato não são graves, mas podem ter impacto em curto e em longo prazo dos domínios do funcionamento biológico, psicológico e social (Taylor *et al.*, 2004). Estudos randomizados controlados do MFD sugerem que a insônia, a redução do apetite e a cefaléia são particularmente comuns, em curto prazo (Graham e Coghill 2008). Há também algumas evidências de aumento dos níveis de emotividade, no retraimento social, em náuseas e dores abdominais (Wigal *et al.* 2006). No entanto, argumenta-se que alguns destes efeitos adversos são devido a problemas preexistentes já associados com o TDAH antes do tratamento (Efron *et al.* 1997; Rapport *et al.* 2008). Já Sonuga-Barke *et al.*(2009) encontraram uma estreita relação de efeitos adversos do MFD com problemas restritos ao apetite e do sono e estes eventos não eram previsíveis com base nas informações disponíveis, assim, esses desfechos seriam devido a um mecanismo subjacente um pouco distinto daqueles dos efeitos terapêuticos determinados.

De uma perspectiva clínica, o objetivo da dosagem inicial em um medicamento estimulante é estabelecer a melhor resposta terapêutica com a menor dose e com o menor número de efeitos adversos. Apesar das melhores tentativas de fazer isso, nos ensaios clínicos de tratamento de pacientes nunca medicados, uma proporção relativamente pequena, mas significativa dos participantes, sofrem persistentes reações adversas ao MFD e que levam a retirada do medicamento, mesmo com os ajustes de dose. Estes efeitos adversos são mais acentuados entre crianças pré-escolares (Wigal *et al.* 2006), e crianças com déficit intelectual e social (Aman *et al.* 2005). Apesar da aparente importância da compreensão das causas e relevância clínica destes eventos adversos comuns ao MFD, eles raramente têm sido estudados em profundidade. Considerando que os pesquisadores que realizam os ensaios clínicos são obrigados a obter informações e registros sistematicamente de todos esses eventos que ocorrem durante o tratamento, as relações dos efeitos terapêuticos entre os diferentes eventos adversos nem sempre são investigadas. As evidências quanto ao fato de que os efeitos adversos sejam dose-dependente são contraditórias. Por exemplo, Stein *et al.* (2003) encontrou evidências de que a insônia e a perda de apetite foram observadas somente em doses mais altas em um estudo randomizado, controlado e de dose-resposta. Estes resultados foram consistentes com a idéia de que efeitos adversos podem ser determinados por processos farmacológicos dose-sensíveis de forma semelhante aos efeitos terapêuticos. Há também evidências de um aumento na gravidade com aumento de dose em um estudo de titulação de dose do Multisite Multimodal Treatment Study of Children with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (MTA) (Greenhill *et al.*, 2001). Em contrapartida, Karabekiroglu *et al.* (2008), em um estudo aberto prospectivo, não encontraram efeitos adversos relacionados à dose. Além disso, esses autores analisaram uma série de possíveis preditores de efeitos adversos e constataram que apenas a presença de problemas de conduta comórbido está relacionada a um aumento do risco de tais efeitos. De forma semelhante, em um estudo retrospectivo, Weber *et al.* (2003) não encontraram correlação com a dose diária e de que a ocorrência de sintomas emocionais predissesse níveis mais altos de efeitos adversos. McGough *et al.* (2006) demonstraram um aumento do risco de irritabilidade e retraimento social associado com variantes de genes relacionados ao

sistema de receptor de dopamina. Stein *et al.* (2005) encontraram efeitos colaterais variados em função do polimorfismo DAT1, enquanto que Leddy *et al.* (2009) demonstraram que esse genótipo pode ser um moderador do efeito do tratamento no apetite.

1.4.2 Farmacogenética e o TDAH

A promessa da farmacogenética do TDAH é muito abrangente, e inclui o potencial para desenvolver esquemas de medicação individualizada que melhorem a resposta do sintoma, diminuam o risco de efeitos colaterais, melhorem a tolerabilidade e assim contribuir para a adesão ao tratamento em longo prazo, melhorando a eficácia geral. Os candidatos óbvios para as investigações farmacogenômicas incluem enzimas polimórficas de metabolização de fármacos, os transportadores, e os alvos da doença e os caminhos do medicamento (Masellis *et al.*, 2002). Os efeitos dramáticos e rápidos de medicamentos estimulantes no controle dos sintomas de TDAH indicam vários candidatos fortes para a análise farmacogenética. As evidências que demonstraram a eficácia do tratamento farmacológico com metilfenidato também impulsionaram a pesquisa básica para focar o sistema catecolaminérgico na identificação da base genética do TDAH. A farmacogenética converge em modelos que investigam o papel do genótipo na predição de resposta ao tratamento individual para os principais alvos do medicamento que são os receptores e transportadores. Até agora, entretanto, os resultados dos estudos de farmacogenética do TDAH são variáveis.

Os genes para receptor dopaminérgico D4 (*DRD4*) e para o transportador de dopamina (*DAT1*) foram os mais estudados, principalmente polimorfismos de número variável de repetições em *tandem* (VNTR). O *DAT1* ou *SLC6A3* tem um papel chave na regulação da neurotransmissão de dopamina e é o maior sítio de ação do MFD. A maioria dos estudos de associação ao TDAH se concentra em um VNTR de 40 pares de bases (pb) na região 3'-UTR do gene. Dez diferentes alelos

podem ser encontrados que variam de três a treze repetições, sendo o alelo com dez repetições o mais frequentemente encontrado em todo o mundo. Winsberg e Comings (1999) foram os pioneiros ao verificar a associação entre homozigose para o alelo de dez repetições do *DAT1* e pior resposta ao MFD em trinta crianças afro-americanas com TDAH; houve um aumento significativo na frequência dos indivíduos com duas cópias do alelo de dez repetições no grupo não-respondedor (86%) em comparação com o grupo respondedor (31%). Esse achado foi replicado em uma amostra de cinquenta meninos brasileiros. As proporções de pacientes que responderam ao tratamento com MFD foram de 75 e 47%, respectivamente, para os grupos sem e com o genótipo 10/10 (Roman *et al.*, 2002). Ao contrário desses estudos, Kirley *et al.* (2003) e Stein *et al.* (2005) encontraram uma associação significativa entre o alelo de dez repetições e melhor resposta ao MFD. Em 2005, outros dois estudos não conseguiram encontrar associação entre as variantes de *DAT1* e resposta ao MFD, mas um deles mostrou dados que havia excesso de genótipo 10/10 e alelos de 10 repetições entre não-respondedores que não alcançou significância estatística (van der Meulen *et al.*, 2005; Langley *et al.*, 2005). A avaliação com parte da amostra do trabalho aqui realizado e o gene *DAT1* não detectou associação com resposta ao medicamento (Zeni *et al.*, 2007)

No gene *DRD4*, o polimorfismo mais investigado é um VNTR com uma unidade de repetição com 48 pb no terceiro éxon, que pode se repetir de duas a onze vezes, dos quais os alelos de duas, quatro e sete repetições são os mais comuns em diferentes populações. Tahir *et al.* (2000) apresentaram uma evidência indireta da associação entre o alelo de sete repetições no *DRD4* e resposta ao MFD em paciente com TDAH. Hamarman *et al.* (2004) evidenciaram que crianças com o alelo de sete repetições não obtiveram a mesma normalização dos sintomas com doses de 50 mg/dia do que aquelas sem este alelo e que necessitariam de uma dose de MFD 1,5 vezes maior para alcançar a melhora dos sintomas ($p=0,002$ e $p < 0,001$; respectivamente). Outros dois estudos não demonstraram nenhuma associação entre resposta ao MFD e a presença ou ausência do alelo de 7 repetições (Kereszturi *et al.*, 2008; Tharoor *et al.*, 2008). Dados do Preschool ADHD Treatment Study (PATS) mostraram que indivíduos com o alelo de 7 repetições

exibiam mais retraimento social com o aumento de dose do MFD e homozigotos para o alelo de 4 repetições apresentavam um aumento de risco para comportamentos furtivos com o uso do MFD (McGough *et al.*, 2006). Cheon *et al.* (2007) relataram alta proporção de homozigotos para o alelo de 4 repetições entre bons respondedores para o MFD. Já Zeni *et al.* (2007) não observaram nenhuma influência dos genótipos do *DRD4* na resposta e no desenvolvimento de efeitos adversos ao metilfenidato.

No receptor adrenérgico α -2A (ADRA2A), uma transversão C→G na posição -1291 foi investigada. Polanczyk *et al.* (2007b) estudaram a associação entre este polimorfismo e a resposta ao tratamento com MFD em 106 crianças e adolescentes, encontrando uma interação significativa entre o alelo G e a melhora dos sintomas de desatenção após três meses de tratamento. Da Silva *et al.* (2008) também observaram a presença do alelo G associada significativamente com escores de desatenção menores depois de um mês de tratamento com MFD. Cheon *et al.* (2009) observaram uma boa resposta ao tratamento com MFD entre 76,9% dos portadores do genótipo GG, em comparação com apenas 46,0% e 41,7% daqueles com genótipos CG e CC, respectivamente.

O gene da Catecol-O-metil-transferase (*COMT*) que atua no catabolismo de DA e NA também foi muito estudado. O polimorfismo funcional é caracterizado pela transição G→A, causando uma substituição do aminoácido valina para metionina nos códons 108/158 das formas S-COMT e MB-COMT, respectivamente. Esta troca de aminoácidos afeta a termoestabilidade da enzima MB-COMT, sendo a variante *Val* associada a quatro vezes mais atividade enzimática do que a variante *Met* (Chen *et al.*, 2004). Cheon *et al.* (2008) identificaram que 62,5% das crianças com TDAH que eram boas respondedoras ao medicamento eram homozigotas para o alelo *Val*, enquanto que 41,7% e 11,7% tinham o genótipo *Val/Met* e *Met/Met*, respectivamente. Kereszturi *et al.* (2008) sugeriram que a presença do alelo *Val*, tanto em heterozigose como em homozigose, estava associado à melhor resposta ao MFD, os homozigotos *Val/Val* apresentavam maior decréscimo dos escores de hiperatividade-impulsividade que os homozigotos *Met/Met*. McGough *et al.* (2009) detectaram o efeito do polimorfismo nos efeitos adversos de irritabilidade e dores de

cabeça e estômago. Salatino-Oliveira *et al.* (2011) sugeriram que meninos com TDAH que portavam pelo menos um alelo *Met* têm resposta mais rápida ao medicamento nos sintomas de oposição comparados aos homozigotos para o alelo *Val*.

Além desses, há poucos estudos sobre outros genes que possam atuar como preditores genéticos na resposta ao tratamento. Com relação à proteína 25 Kd associada à sinaptossoma (SNAP25), um estudo demonstrou associação entre o polimorfismo T1065G com melhor resposta ao MFD e o polimorfismo T1069C com efeitos adversos como tiques motores, movimentos orais e pegar ou morder (Mc Gough *et al.*, 2006). Guimarães *et al.* (2009) mostraram uma interação significativa entre a presença do genótipo de alta atividade da monoamina oxidase A (MAO-A) e a melhora dos sintomas de oposição ao longo do tratamento com MFD. Um estudo com polimorfismos em três genes serotoninérgicos (*HTR1B*, *HTR2A*, e *5-HTT*) não demonstrou associação com resposta ao MFD ou desenvolvimento de efeitos adversos (Zeni *et al.*, 2007); entretanto, outro estudo evidenciou uma interação significativa entre um polimorfismo na região promotora do gene 5-HTT, a dosagem do MFD e um teste de performance matemática, bem como um efeito de um polimorfismo no íntron 2 desse gene e a melhora dos sintomas de TDAH (McGough *et al.*, 2009). O papel do transportador de noraepinefrina (NET1) também ainda não foi esclarecido na farmacogenética do TDAH. Um estudo mostrou a associação entre o polimorfismo G1287A e a redução de sintomas de hiperatividade-impulsividade durante o tratamento com MFD (Yang *et al.*, 2004), mas esses resultados não foram replicados em outros dois estudos (McGough *et al.*, 2009; Kooij *et al.*, 2008)

Embora existam muitos trabalhos na área de farmacogenética do TDAH, pouca atenção tem sido dedicada aos potenciais efeitos de variabilidade genética no metabolismo de drogas e farmacocinética. Isto pode ser devido ao fato de que enquanto o metilfenidato é específico em termos de seu local de ação, suas vias metabólicas são mal compreendidas. O estudo de Patrick *et al.* (2007) demonstrou a inibição da via metabólica da carboxilesterase pela ingestão de álcool e identificou a associação de um indivíduo metabolizador lento de metilfenidato com um possível

polimorfismo nesse gene. Assim, existe uma necessidade reconhecida para a exploração de novas fontes de diferenças interindividuais na farmacocinética do metilfenidato. Nesse sentido, a identificação e a caracterização do gene *CES1* é um importante passo.

1.5 CARBOXILESTERASES

As carboxilesterases (CES) pertencem à família multigênica de proteínas α,β -hidrolases e catalisam a hidrólise de uma ampla variedade de componentes como ésteres, tioésteres, carbamatos e amidos, ajudando a metabolizar substâncias endógenas e xenobióticos envolvidos na biotransformação e detoxificação. Elas são expressas em vários tecidos de animais e geralmente encontradas no retículo endoplasmático das células. Drogas e medicamentos, incluindo estimulantes, heroína, cocaína, salicilatos, esteróides, e agentes anti-cancerígenos como o irinotecano (CPT-11) são substratos das carboxilesterases (Satoh, 2002; Redinbo et al, 2003)

1.5.1 Classificação e nomenclatura das CES

Conforme a classificação das esterases de Aldridge (2006), a superfamília serina das esterases, por exemplo, acetilcolinesterase, butirilcolinesterase e as carboxilesterases foram incluídas no grupo das B-esterases. Inicialmente, as isoenzimas das carboxilesterase foram classificadas pela especificidade ao substrato e pelo potencial de ionização (pI). Entretanto, essa classificação é ambígua na sobreposição de especificidades ao substrato. Uma única reação esterolítica é mediada por vários tipos de enzima (Takai *et al.*,1997). Em 1998, a classificação e nomenclatura das isoenzimas das carboxilesterase dos mamíferos foram organizadas baseadas nas análises filogenéticas das sequências, sendo as

três principais: CES1, CES2 e CES3 (Sato e Hosokawa, 1998). Com a descoberta de uma nova isoenzima a partir da clonagem de cDNA de uma proteína excretada da urina de gato (Miyazaki *et al.*, 2003) e outra isoenzima que possuía estrutura diferente das demais famílias da CES encontrada no fígado de camundongo (Watanabe *et al.*, 1993), novamente foi sugerida uma classificação das CES em cinco subfamílias baseada na alta homologia e similaridade das características, CES1, CES2, CES3, CES4 E CES5 (Satoh e Hosokawa, 2006).

Contudo, devido às inúmeras confusões com as nomenclaturas das carboxilesterases dos mamíferos, em 2010, a Human Gene Organization (HUGO) Nomenclature Committee (HGNC) recomendou a utilização de uma nova forma para se referir aos cinco genes da família das carboxilesterases dos humanos, camundongos e ratos. Diferenças entre os símbolos foram utilizados, "CES" (humana) e "Ces" (ratos e camundongos), seguido do número da família (por exemplo, humanos *CES1*). Onde foram identificados vários genes para uma família ou onde ocorreu um confronto com um nome de gene existente, uma letra foi adicionada (por exemplo, *CES4A* em humanos; *Ces1a* em ratos e camundongo) que reflete parentesco gênico entre espécies de roedores. Pseudogenes foram nomeados pela adição de "P" e um número ao nome do gene humano (por exemplo, humanos *CES1P1*) ou usando uma nova letra seguido de ps para pseudogenes de camundongo e rato (por exemplo, *Ces2d-ps*). Isoformas de genes transcritos foram nomeados, adicionando a ID GenBank ao símbolo gene (eg, *CES1_AB119995* humana ou camundongo *Ces1e_BC019208*). Assim, as isoenzimas humanas foram classificadas em CES1, CES2, CES3, CES4A, CES5A, e ainda há a presença do pseudogene CES1P1 (Homes *et al.*, 2010). A CES1 é a principal carboxilesterase do fígado (Shibata *et al.*, 1993); CES2, a principal enzima intestinal, mas também presente no fígado (Langmann *et al.*, 1997); CES3, expressa no cérebro, fígado e cólon (Pindel *et al.*, 1997; Sanghani *et al.* 2004); CES5A (também chamado CES7 ou cauxin), é a proteína urinária principal do gato doméstico também presente em tecidos humanos (Miyazaki *et al.*, 2003)

1.5.2 Localização

Os genes da carboxilesterases foram mapeados em uma região de 10 a 30kb no cromossomo 16 (16q12.2-q22.1). *CES1P1* (pseudogene CES1-like), *CES1* e *CES5A* foram localizados em um *cluster* (*cluster 1*), enquanto *CES2*, *CES3* e *CES4A* estavam em um grupo separado (*cluster 2*) no mesmo cromossomo. Genes do *cluster 1* (*CES1* e *CES5A*) são transcritos na fita negativa, enquanto os genes do *cluster 2* (*CES2*, *CES3* e *CES4A*) são transcritos na fita positiva. *CES1* e *CES4A* contêm 14 éxons, *CES3* e *CES5A*, 13 éxons e *CES2*, 12 éxons (Homes *et al.*, 2010).

1.5.3 Estrutura

Os elementos-chave das estruturas da CES1, CES2 e CES3 são: a seqüência líder, sítios de glicosilação Asn, resíduos Cys que participam de pontes dissulfeto, tríade catalítica (Ser221, His468 e Glu354), furo oxiânion (Gly123-Gly124) e a seqüência de retenção microsomal. Estes elementos estruturais importantes são todos altamente conservados entre as isoenzimas (e esterases relacionadas) e seus papéis foram cuidadosamente descritos em revisões recentes (Hosokawa *et al.*, 2008; Imai, 2006; Redinbo, 2005). O sítio de glicosilação em CES1, Asn79 difere substancialmente dos putativos em CES2, Asn111 e 276 Asn e CES3, Asn105. Em CES1, esta porção de carboidratos parece ajudar no enovelamento de proteínas, na solubilidade, e estabilização do trímero. Os domínio $\alpha\beta$ fornecem a maior parte da área de superfície dentro da fenda. (Bencharit *et al.*, 2003). Os papéis dos grupos de carboidratos em CES2 e CES3 não são conhecidos. A principal diferença entre CES2 e CES3 contra CES1 é a deleção de uma estrutura de laço grande perto do sítio de ligação do substrato "flexível" em CES1. Esta exclusão de 14 aminoácidos em CES2 e CES3 torna mais acessível seus sítio ativos ao solvente do que em CES1 (Sanghani *et al.*, 2009).

Carboxilesterases contêm três sítios de ligação: o sítio ativo, a porta lateral, e

o sítio Z. O sítio ativo está localizado na base da fenda catalítica, que em CES1 é relativamente grande e confortável para promover a ligação promíscua de substratos. Adjacente ao sítio ativo, e separado da fenda catalítica por uma parede fina de cadeias laterais de aminoácidos, é a porta lateral. Acredita-se que este sítio de ligação serve como uma entrada de substrato secundário e/ou poro para a liberação de produto. A entrada para a fenda catalítica é ladeada pela primeira e décima α -hélice, um motivo comum para o sítio ativo de enzimas que processam ácidos graxos e ésteres. Adjacente à abertura da fenda, localiza-se o sítio Z, que é um sítio de ligação à superfície que controla o equilíbrio trímero-hexâmero da enzima (Bencharit *et al.*,2003)

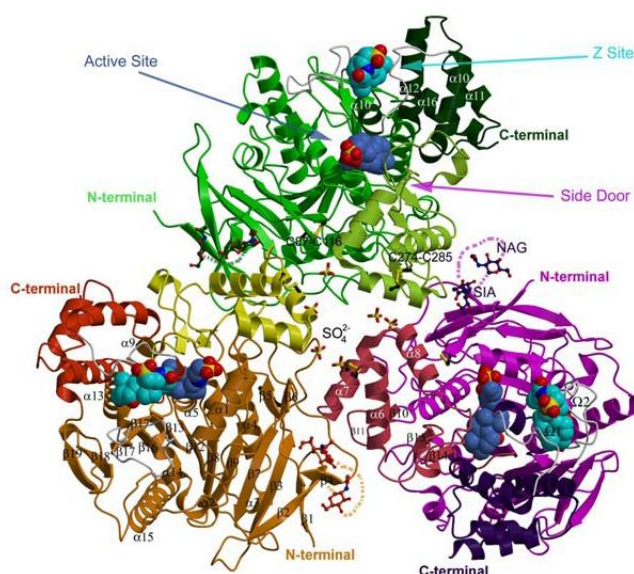


Figura 1. Estrutura tridimensional da CES1. Os domínios catalíticos estão em verde, magenta e laranja; os domínios $\alpha\beta$ estão em verde claro, rosa e amarelo; e os domínios regulatórios estão em verde escuro, roxo e vermelho. Adaptado de Bencharit *et al.* (2003)

1.5.4 CES1 e a especificidade ao metilfenidato

CES1 e CES2 possuem diferentes especificidades ao substrato (Sato *et al.*,2002). CES1 catalisa a hidrólise do metiléster da cocaína e CES2 catalisa a

hidrólise do benzoiléster dessa substância (Brzezinski *et al.*, 1994; Pindel *et al.*, 1997). CES1, mas não CES2, hidrolisa meperidina (Zhang *et al.*, 1999); por outro lado, CES2 hidrolisa aspirina e procaína, entretanto CES1 não (Takai *et al.*, 1997). Mesmo com sobreposição de substrato tal como heroína e CPT-11, as eficiências catalíticas são significativamente diferentes (Pindel *et al.*, 1997; Humerckhouse *et al.*, 2000). Baseado nas análises das estruturas, CES1 preferencialmente cliva as ligações éster com grupo álcool pequeno e grupo acil grande, por exemplo, metiléster da cocaína e meperidina; e CES2 prefere o substrato com grupo acil pequeno e grupo álcool grande (benzoiléster da cocaína, CPT-11 e heroína) (Bosron e Hurley, 2002). Sun *et al.* (2004) demonstraram pela cinética da hidrólise dos enantiômeros de MFD que CES1A1 possui uma alta eficiência catalítica, enquanto que CES2 e CES3 não são ativos quando o MFD é o substrato. Na tentativa de demonstrar uma potencial correlação estrutural com a maior eficiência catalítica de *d*-MFD versus *l*-MFD, uma análise 3-D, utilizando a posição experimentalmente observada da homatropina como guia, não demonstrou diferença na interação entre ambos. É possível que a enzima possa apresentar uma preferência por uma determinada orientação do benzil contra os substituintes de piperidina do metilfenidato dentro do bolso de substrato. No experimento, as interações foram consideradas permutáveis, mas é provável que as suas características químicas diferentes influenciarão a posição real do substrato quando ligado à enzima (Figura 2).

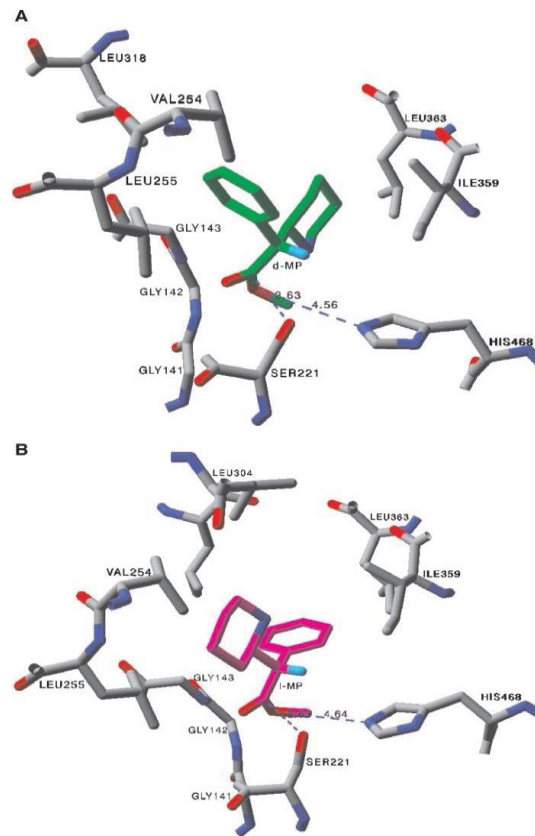


Figura 2. Cristalização dos dois isômeros de metilfenidato no sítio ativo da CES1; as distâncias do grupo hidroxila da Ser221 para o carbono carbonil do metilfenidato são de 2.6 Å para ambos d-MFD (A) e l-MFD (B); as distâncias do grupo imidazol da His468 para a ligação metil-éster do metilfenidato são de 4.6 Å para os dois isômeros. Adaptado de Sun *et al.* (2004)

1.5.5 Variabilidade genética em CES1

Existe a possibilidade de que variações individuais na atividade da carboxilesterase do fígado sejam causadas pela diferença nos níveis de expressão das isoenzimas CES1, podendo, assim, contribuir para efeitos adversos e aumento da sensibilidade/resistência à medicação (Evans and McLeod, 2003).

Ainda há poucas informações disponíveis na variação genética desse gene. Em 2004, Marsh *et al.* re-sequenciaram os genes carboxilesterases 1 e 2 em 120 indivíduos de três populações (americanos de ancestralidade europeia, africana e asiática) para descobrir novos SNPs. Eles encontraram 16 SNPs para o gene CES1

e 13 SNPs para *CES2*, as frequências alélicas e as frequências dos haplótipos estimados variaram significativamente entre as populações africanas e européias (Marsh et al, 2004). Hosokawa et al (2008) isolaram dois genes codificando *CES1A*, que foram designados como *CES1A1* e *CES1A2*. Estes genes estão localizados no cromossomo 16q13-q22.1, de forma ponta a ponta, separados por cerca de 9 kb da região intergênica. (Figura 3).

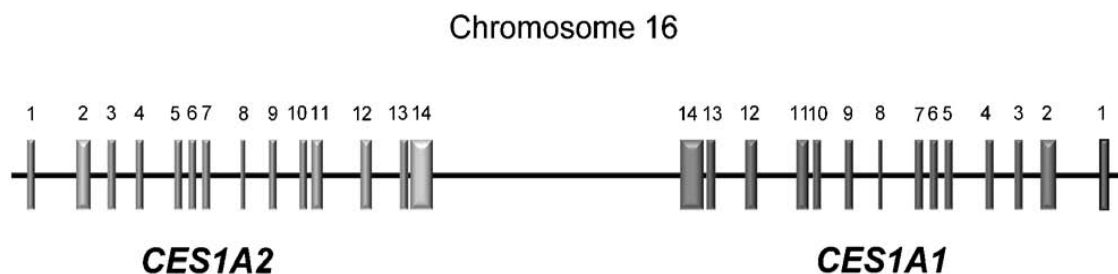


Figura 3. Ilustração das estruturas genômicas de genes *CES1A*; ambos *CES1A1* e *CES1A2* estão localizados no cromossomo 16 com uma estrutura de ponta a ponta; os dois genes compartilham uma região intergênica comum abrangendo 9 kbp e têm suas próprias seqüências regulatórias. Retângulos indicam éxons e a linha horizontal indica o DNA genômico com a direção da esquerda para a direita definindo o sentido da fita senso. Os números indicam os números dos éxons. Adaptado de Hosokawa *et al.* (2008).

Uma comparação das seqüências de nucleotídeos dos genes *CES1A1* e *CES1A2* revelou cerca de 98% de homologia em 30.216 nucleotídeos desde o sítio de iniciação da tradução (ATG) até o sítio anterior a cauda de poli-A. Existem apenas seis diferenças de nucleotídeos resultando em quatro diferenças de aminoácidos na fase aberta de leitura, todas no éxon 1. Na região 5' UTR do *CES1A1* e do *CES1A2*, a diferença nas seqüências de nucleotídeos foi de 91% em 1.000 pb. Vários possíveis sítios de ligação para fatores de transcrição foram identificados nessa região, mas nenhum TATA-box estava presente em ambos os promotores. Sítios de ligação putativos ao fator de transcrição Sp1 no promotor do *CES1A1* foram localizados na posição -196 (Sp1-A) e -84 (Sp1-B) e outro de ligação ao CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) na posição -290 do sítio de iniciação de tradução. Entretanto, apenas um sítio de ligação putativo ao fator de ligação Sp1 no

promotor do *CES1A2* foi encontrado na posição -195 (Sp1-A) e nenhum sítio de ligação ao CCAAT/*enhancer binding protein* (C/EBP). Na análise de expressão, os níveis de mRNA do *CES1A1* é muito maior que os do *CES1A2* no fígado, no pulmão e coração. Isso porque C/EBP α/β e Sp1 se ligam aos sítios de ligação presentes no *CES1A1* e aumentam a atividade do promotor. Embora haja polimorfismos no promotor e nas sequências líderes, os dois genes *CES1A* irão produzir uma proteína microsomal CES1 idêntica. (Hosokawa *et al.*, 2008).

Zhu *et al.* (2008) identificaram duas variantes: Gly143Glu (rs71647871) no éxon 4 e Asp260fs (rs71647802) no éxon 6 do gene *CES1*, associadas à concentração sanguínea de metilfenidato e relacionadas com padrões distintos de resposta hemodinâmica, constituindo um potencial alvo de investigações de efeitos adversos. Entretanto este último polimorfismo parece ser muito raro (Zhu *et al.*, 2008). Recentemente, Nemoda *et al.* (2009) investigaram o papel do polimorfismo Gly143Glu na farmacogenética da resposta ao MFD. Eles observaram em 95 crianças húngaras respondedoras ao tratamento que os cinco indivíduos portadores do alelo *Glu* necessitaram de doses mais baixas de MFD para a redução dos sintomas. Yamada *et al.* (2010) re-sequenciaram bidirecionalmente o gene da *CES1* em 170 indivíduos e detectaram variações genéticas com potenciais utilidades nos estudos farmacogenéticos. Eles investigaram 28 SNPs nos quais a frequência do alelo menos frequente (MAF) era maior que 5% em *CES1*, *CES2* e *CES4* e sua possível associação com hepatotoxicidade induzida por isoniazida, entretanto, sem resultados significantes quando os valores P foram ajustados. Onze SNPs no gene *CES1* estavam em grande desequilíbrio de ligação. Eles verificaram ainda que o SNP -75 T>G (rs3815583) apresentava uma tendência a aumentar o risco de hepatotoxicidade quando analisado isoladamente.

CAPÍTULO II

JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade apresenta uma alta prevalência, com prejuízo significativo na vida dos pacientes e familiares, e um consequente custo financeiro. Desta forma, o TDAH exerce um grande impacto em nossa sociedade. Devido à heterogeneidade da resposta ao tratamento com estimulantes, a dose ideal necessária e a tolerabilidade geraram a hipótese de que fatores genéticos possam determinar pelo menos parcialmente essas diferenças. A maioria dos estudos que investiga a resposta do metilfenidato no TDAH está focada nas variantes genéticas dos alvos do medicamento, como os transportadores e receptores, e há pouca atenção na variabilidade genética do metabolismo do fármaco. Ao contrário da anfetamina e da atomoxetina, que são metabolizadas por CYP2D6 que é uma variante genética bem conhecida em humanos, o metilfenidato é convertido a ácido ritalínico inativo pela CES1 que é um gene pouco estudado. Estudar os fatores genéticos que possam causar esta variabilidade na resposta é de grande importância para os pacientes e familiares. Assim, no futuro talvez possamos identificar o melhor tratamento individual.

O polimorfismo -75 T>G (rs3815583) foi escolhido por demonstrar uma tendência à hepatotoxicidade devido ao uso de isoniazida (Yamada *et al.*, 2010), dessa forma poderia estar associado aos efeitos adversos do metilfenidato.

Assim, este estudo tem como objetivo geral verificar se o polimorfismo em *CES1* está associado à resposta terapêutica do tratamento.

São objetivos específicos deste trabalho:

- Estimar a frequência gênica e genotípica do polimorfismo -75 T>G em uma amostra de crianças tratadas com metilfenidato;
- Comparar a frequência gênica e genotípica do polimorfismo investigado entre usuários de metilfenidato que tenham desenvolvido efeitos adversos.

CAPÍTULO III

Association of a Carboxylesterase 1 polymorphism with appetite reduction in children and adolescents with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder treated with methylphenidate

Manuscrito parcialmente aceito com pequenas revisões na revista The Pharmacogenomics Journal

Association of a Carboxylesterase 1 polymorphism with appetite reduction in children and adolescents with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder treated with methylphenidate.

Estela M Bruxel¹, B.S.; Angélica Salatino-Oliveira¹, M.S.; Julia P Genro ¹,Ph.D.; Cristian P Zeni², MD,Ph.D.; Guilherme V Polanczyk²,M.D.,Ph.D.; Rodrigo Chazan²,M.D.; Luis A Rohde², M.D., Ph.D.; Mara H Hutz¹,Ph.D.

¹ Genetics Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

²Division of Child and Adolescent Psychiatry, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, and Instituto de Psiquiatria do Desenvolvimento para a Infância e Adolescência, Porto Alegre, Brazil

Corresponding author:

Mara H. Hutz

Departamento de Genética, UFRGS

Caixa Postal 15053

91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

Tel: 55 51 3308 6720

Fax: 55 51 3308 7311

E-mail: mara.hutz@ufrgs.br

Running Title: CES1 polymorphism and MPH adverse reactions

Source of grants: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP, Brazil).

ABSTRACT:

Carboxylesterase 1 is the main enzyme involved in Methylphenidate metabolism. The aim of the present study was to evaluate the association between a -75 T>G polymorphism and appetite reduction in children with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD). A clinical sample of 213 children with ADHD was included in the study. The primary outcome was appetite reduction measured by the Barkley Stimulant Side Effect Rating Scale according to parental reports. The G allele was significantly associated with appetite reduction scores during treatment [$p = 0.046$]. A significant interaction between the G allele and treatment over time for appetite reduction scores was also observed [$p = 0.026$]. The G allele carriers presented a higher risk for appetite reduction worsening when compared with T allele homozygotes (OR=3.47, $p = 0.009$). The present results suggest an influence of *CES1* -75 T>G polymorphism on the worsening of appetite reduction with MPH treatment in youths with ADHD.

Keywords: Attention deficit hyperactivity disorder; carboxylesterase 1; adverse reaction; appetite reduction; methylphenidate; pharmacogenetics

Introduction

Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) is one of the most common child and adolescent psychiatric disorders, affecting around 5% of children worldwide ¹. Stimulants like methylphenidate (MPH) and amphetamine are widely recognized as the first line treatment for Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) and they have been prescribed for more than 60 years ². The use of MPH in children and adolescents with ADHD is associated to rates of effectiveness around 70% and the medication is generally well tolerated ³. One of the most recognized brain effect of MPH and its potential mechanism of action for improvement of ADHD symptoms is dopamine transporter blockade, although MPH blocks efficiently norepinephrine transporter as well^{4,5}.

Most of the studies investigating MPH pharmacogenetics in ADHD focused on genetic variants of drug targets, such as transporters and receptors ^{6,7}. Surprisingly, little attention has been paid to the genetic variability of drug metabolism in the area of ADHD pharmacogenomics.

Methylphenidate has two chiral centers and there are four isomers, a *d,l-erythro*-methylphenidate pair and a *d,l-threo*-methylphenidate pair. Only the racemic mixture of the *threo* pair of enantiomers (*d,lthreo*-methylphenidate) is used therapeutically because it has less adverse effects than the *erythro* pair ⁸.

The carboxylesterase 1 (CES1) gene encodes the main enzyme involved in MPH metabolism. In oral administration studies, the racemic *d,l*-methylphenidate undergoes stereoselective clearance to ritalinic acid before entering the systemic circulation. Then, plasma concentrations of *d*-methylphenidate are higher than those of *l*-methylphenidate, which is eliminated faster than *d*-methylphenidate. Zhu *et al.* ⁹ identified two CES1 variants with reduced enzyme activity in a compound heterozygote subject participating in an MPH pharmacokinetics study. The 428G-A transition in exon 4 of the CES1 gene results in glycine-to-glutamate substitution (Gly143Glu), whereas a 1-bp deletion (780delT) in exon 6 produces a frameshift and

premature truncation of the protein (Asp260fs). These variants led to elevated MPH blood concentrations and were associated with distinct patterns of hemodynamic response. Nemoda et al ¹⁰ based on five heterozygous patients reported an association between CES1 Gly143Glu polymorphism and MPH dose. These authors suggested that carriers of the Glu-allele required lower MPH doses. Because these variants have low allele frequencies (< 5%) in all ethnic groups so far investigated ⁹, their usefulness for pharmacogenetics studies is small. Recently, Yamada *et al.* ¹¹ re-sequenced bidirectionally the CES1 gene in 170 subjects and detected genetic variants which were evaluated in relation to their potential usefulness in pharmacogenomic studies. Among the polymorphisms described, one, -75 T>G (rs3815583), located in the 5' UTR presented a trend for association with hepatotoxicity determined by isoniazid use.

Adverse events associated to methylphenidate are not severe, but may have an impact in the short and long term domains of functioning ¹². The most commonly reported MPH adverse event is appetite reduction with weight loss ¹³⁻¹⁵. Independently of its duration, appetite reduction is one of the most frequent reasons for dose reduction or discontinuation of stimulant therapy. It is important to note that around 12% of subjects stop medication due to appetite reduction ¹⁶⁻¹⁸.

Therefore the aim of the present study was to evaluate the association between this CES1 newly described polymorphism (-75 T>G) and appetite reduction in children and adolescents with ADHD.

Methods and Materials

Subjects

The sample for this investigation included children and adolescents who were consecutively evaluated for 2 years in the ADHD Outpatient Clinic at the Hospital de Clinicas de Porto Alegre. Inclusion criteria for this investigation were: ADHD diagnosis according to DSM-IV criteria, age between 4 and 17 years, drug-naive for

MPH, and prescribed MPH doses of at least 0.3 mg/kg/day. The diagnoses of ADHD and comorbidities were achieved through a three-step process: application of semistructured interviews (Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children-Epidemiologic Version), diagnostic discussion in a clinical committee, and clinical evaluation with the child and his/her parents. Experienced child psychiatrists confirmed all generated diagnoses^{19, 20}. During the study, 213 children fulfilled inclusion criteria to participate. The Ethical Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre approved the study protocol. Parents provided written informed consent and probands provided verbal assent to participate.

Diagnostic Procedures and Clinical Assessments

The primary outcome variable was appetite suppression measured through the parent-rated Barkley Stimulant Side Effect Rating Scale (BSSERS)²¹. This scale is composed of 17 side effects commonly associated with MPH treatment. It is the most used rating scale for adverse events in psychopharmacological trials with MPH in ADHD (Martins *et al.*, 2003; Polanczyk *et al.*, 2007). In this study, in order to avoid multiple testing, only the appetite reduction score was analyzed. This choice was based on the clinical relevance of this side effect for adherence to treatment. Appetite reduction were ranked on a 9-point scale from absence of this adverse event (score = 0) to the most severe appetite suppression (score = 9). The scale was applied by child psychiatrists blinded to genotype at baseline and at 1 and 3 months of treatment. Patients were treated according to the program's protocol. Dosages of short-acting MPH were augmented until no further clinical improvement was detected or until there were significant adverse events²². Methylphenidate was administered preferentially twice daily (at 08:00 and 12:00 hours), but an extra dose between 17:00 and 18:00 hours was allowed for children needing continuous coverage during evenings. Psychiatrists were blinded to patients' genotypes. Clinical assessments were performed by child psychiatrists at baseline before medication and after 1 and 3 months of MPH treatment.

Genotyping

DNA was extracted from whole blood lymphocytes following the method described by Lahiri and Nurnberger²³. The rs3815583 (-75 T>G) polymorphism was genotyped using a Taqman SNP genotyping assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the manufacturer recommended protocol for the TaqMan allelic discrimination system (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Statistical Analyses

The χ^2 test or Fisher exact test was used for categorical variables; for continuous variables with and without normal distribution, *t* test and Wilcoxon-Mann-Whitney tests were used, respectively. Potential confounders evaluated were IQ, ADHD subtype, comorbid conditions (mood, anxiety, and disruptive behavior disorder), age, sex, MPH dose, concomitant prescription of another medication, BSSERS baseline scores, and appetite reduction baseline scores. Potential confounders to be entered in models were defined based on conceptual analyses of the literature and by means of a statistical definition (association with the study factor and with the outcome at $p \leq 0.10$).

Analyses of the effect of different genotypes on the efficacy of the treatment were performed using a mixed-effects model, which produces a flexible framework for the analysis of repeated measures while accounting for missing data (e.g., loss to follow-up)²⁴⁻²⁶. The best covariance structure fitting the data was selected based on the one with the lowest Akaike information criterion (AIC) value among those in which convergence has been achieved. Independent factors included in the model were treatment over time and group assignment (defined as the presence of the G allele). The appetite reduction baseline scores and the mean daily doses of MPH prescribed at baseline and at the 1-month assessment were included in the model as a covariate for conceptual reasons. All possible interactions were tested, but non-significant interactions were dropped in the final model using a backward elimination

procedure. SPSS version 18.0 was used for all analyses (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A significance level of 5% was set for all analyses (except for potential confounders, as indicated previously). Tests were two-tailed.

Results

From the 213 subjects investigated, 8 were excluded from the study because their appetite reduction baseline scores were equal to 9 on the Barkley Stimulant Side Effect Rating Scale (BSSERS); therefore there was no room for further worsening. The estimated allele frequencies for the included subjects were 0.80 for the T allele and 0.20 for the G allele. The genotype frequencies were 0.63 for *T/T* homozygous individuals, 0.35 for *G/T* heterozygous individuals, and 0.02 for *G/G* homozygous individuals. The genotype distribution did not deviate significantly from Hardy-Weinberg equilibrium. Because of the low frequency of *G/G* homozygous individuals, they were grouped with *G/T* heterozygotes. Therefore, carriers of the G allele were compared with those without this allele (subjects homozygous for the T allele) to explore the effect of the presence of the G allele on outcomes.

Demographic and clinical characteristics of the patients according to the presence of the G allele are shown in Table 1. Although borderline significant differences between the two genotype groups were observed for gender and ethnicity, these characteristics were not associated with the outcome ($P \leq .10$), therefore these features were not considered as potential confounders. Although ethnicity was not a confounder a secondary analysis was performed only with children of European descent with similar results (data not shown but available upon request)

Figure 1 shows the trajectory of appetite reduction scores during MPH treatment based on findings from the mixed-effects model, including treatment over time and the presence of G allele as main effects, appetite reduction baseline scores and the mean daily MPH dose as covariates (conceptual confounders), and significant interactions between these factors during the 3 months of treatment ($n = 205$). The full model for this analysis is provided in Table S1 in Supplement 1. An independent

effect of treatment over time [$F(2,270) = 82.07, p < .001$] and of the appetite reduction baseline scores [$F(1,189) = 83.29, p < .001$] were found. The interaction between these two factors was statistically significant [$F(2,267) = 40.06, p < .001$]. There is no significant effect of the daily mean MPH dose [$F(1,181) = 3.13, p = .078$] on the scores of appetite reduction. Moreover, a significant effect of the presence of G allele [$F(1,197) = 4.04, p = .046$] and a significant interaction effect between the G allele and treatment over time [$F(2,265) = 3.71, p = .026$] were also observed. Also, there was a significant interaction between G allele and appetite reduction baseline scores [$F(1,172) = 4.05, p = .046$]. No third-order interactions were significant. The covariance structure with the lowest AIC value was the Toeplitz one.

In order to closer assess the clinical relevance of the association observed, 118 subjects that started MPH treatment with an appetite reduction score equal to zero (no appetite suppression problem in the baseline) were selected for further analyses. For these analyses scores above 6 were considered to be severe. Table 2 and Figure 2 shows that 34.1% of G carriers with zero score at baseline raised to the highest scores of appetite reduction (6-9) after three months of treatment, whereas only 13% of T homozygotes presented scores at this range after this time. The G allele carriers presented a 3.5 times higher risk to have highest appetite reduction scores when compared with T allele homozygotes (OR=3.47, 95% (CI) = 1.38 - 8.77, $p = .009$).

Discussion

The present results suggest that worsening of appetite reduction due to MPH treatment in children and adolescents is associated with a -75 T>G SNP at the CES1 gene. We are unaware of any previous studies investigating the role of this polymorphism in response to methylphenidate treatment, even more assessing specifically adverse events.

Genetic variants in CES1 genes may contribute to adverse drug reactions and increased sensitivity or resistance to drug treatment. Rare nonsynonymous variants

in CES1 encode enzymes with impaired activities that dramatically alter the pharmacokinetics and drug response. The exact impact of -75 T>G polymorphism on the CES1 enzyme functionality is yet unknown, but, since it is located at the 5' UTR it could have an effect on gene regulation. It is possible that the G-allele has reduced enzyme activity, and carriers of this allele might have higher plasma drug levels; therefore patients with this genotype could be more prone to develop adverse reactions like appetite reduction. Thus, functional studies will be needed to investigate whether this SNP affect CES1 activity. The fact that MPH doses were not associated with genotype in this protocol did not discard this possibility, since clinicians have incremented doses in each follow-up visit according to response and adverse events with initial and follow-up doses that, although not fixed, were supposed to target respectively around 0.3 and 0.7 mg/kg/day. So, the study design is not adequate to investigate the association between genotype and MPH dose.

Appetite reduction due to MPH treatment has been reported by several studies. In 2004, a study demonstrated that methylphenidate reduced energy intake by 23% at moderate doses (0.5 mg/kg) vs. placebo in obese men ²⁷. An open study demonstrated that atomoxetine, a nonstimulant drug also prescribed for ADHD treatment, prescribed conjointly with OROS MPH was associated with significantly greater rates of mild to moderate loss of appetite compared to atomoxetine alone ²⁸. Several other studies confirmed that appetite reduction was not only significantly more prevalent with MPH than with placebo, but also one of the most prevalent and impairing short-term adverse event ²⁹⁻³².

Three different investigations assessed MPH pharmacogenetic effects on appetite reduction. A case-control study reported an association of the DAT1 9-repeat allele with appetite reduction in response to stimulant administration. This study was the first to examine the suppression of appetite ratings of MPH in relation to DAT1 genotype variation ³³. Leddy *et al.* also demonstrated an effect MPH dose-response on eating with DAT1 in ADHD youths ³⁴. Nevertheless, no associated between appetite reduction and dopaminergic and serotonergic genes was found after the first month of treatment in part of the sample investigated herein ¹⁹.

The observational-naturalistic design of our study, moderate sample size and the absence of MPH plasma level information in our patients are limitations of the present study. We did not have a placebo arm in this trial, so we had no internal control to correct for any effect of time (eg, regression to the mean) or expectancy bias. The worsening in appetite reduction scores in our sample was comparable to that previously reported in placebo-controlled trials^{30, 32}. Although a placebo response was likely present in our study and decreased the power by reducing the measurement precision of drug action on appetite, it is unlikely that a placebo response was systematically related to the polymorphism assessed. In addition, we minimized the chance that the higher appetite reduction scores with methylphenidate treatment detected in carriers of the G allele might be attributed to other events because we performed an extensive assessment of potential confounders between groups with and without the G allele, a strategy not usually performed in previous pharmacogenomic investigations of ADHD and we excluded those youths with the highest scores at baseline. Second, methylphenidate was administered with no control of adherence by investigators. We cannot rule out that lack of adherence occurred to some extent in the remaining sample. Nevertheless, there was an important overall increase in appetite suppression according to the parents during follow-up. As usual, the challenge faced by research into the genetic basis of psychopharmacological drug responses is to identify genes of relative small effect against a background of substantial genetic and environmental variation. Additionally, selection bias and factors, such as socioeconomic status or health care, may differ between individuals.

Despite these considerations, the clinical relevance of this report resides in the fact that it is the first pharmacogenetic report of an association of MPH adverse effects with a gene involved in the pharmacokinetics of this drug. Therefore, the present results should be replicated in larger and independent samples.

Acknowledgements

The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil), and Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP) for financial support.

Financial Disclosures - Potential conflicts of interest

Dr Rohde was on the speakers' bureau and/or acted as consultant for Eli-Lilly, Janssen-Cilag, Novartis and Shire in the last three years (less than U\$ 10,000 per year and reflecting less than 5% of his gross income per year). He also received travel awards (air tickets + hotel) for taking part of two child psychiatric meetings from Novartis and Janssen-Cilag in 2010. The ADHD and Juvenile Bipolar Disorder Outpatient Programs chaired by him received unrestricted educational and research support from the following pharmaceutical companies in the last three years: Abbott, Bristol-Myers Squibb, Eli-Lilly, Janssen-Cilag, Novartis, and Shire. All other authors report no biomedical financial interests or potential conflicts of interest.

References

1. Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, Biederman J, Rohde LA. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry* 2007; **164**(6): 942-948.
2. Spencer TJ. ADHD treatment across the life cycle. *J Clin Psychiatry* 2004; **65 Suppl 3**: 22-26.
3. Wolraich ML, McGuinn L, Doffing M. Treatment of attention deficit hyperactivity disorder in children and adolescents: safety considerations. *Drug Saf* 2007; **30**(1): 17-26.
4. Han DD, Gu HH. Comparison of the monoamine transporters from human and mouse in their sensitivities to psychostimulant drugs. *BMC Pharmacol* 2006; **6**: 6.
5. Szobot CM, Roman T, Hutz MH, Genro JP, Shih MC, Hoexter MQ, *et al.* Molecular imaging genetics of methylphenidate response in ADHD and substance use comorbidity. *Synapse* 2011; **65**(2): 154-159.

6. Kieling C, Genro JP, Hutz MH, Rohde LA. A current update on ADHD pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 2010; **11**(3): 407-419.
7. Polanczyk G, Bigarella MP, Hutz MH, Rohde LA. Pharmacogenetic approach for a better drug treatment in children. *Curr Pharm Des* 2010; **16**(22): 2462-2473.
8. Markowitz JS, Straughn AB, Patrick KS. Advances in the pharmacotherapy of attention-deficit-hyperactivity disorder: focus on methylphenidate formulations. *Pharmacotherapy* 2003; **23**(10): 1281-1299.
9. Zhu HJ, Patrick KS, Yuan HJ, Wang JS, Donovan JL, DeVane CL, *et al.* Two CES1 gene mutations lead to dysfunctional carboxylesterase 1 activity in man: clinical significance and molecular basis. *Am J Hum Genet* 2008; **82**(6): 1241-1248.
10. Nemoda Z, Angyal N, Tarnok Z, Gadoros J, Sasvari-Szekely M. Carboxylesterase 1 gene polymorphism and methylphenidate response in ADHD. *Neuropharmacology* 2009; **57**(7-8): 731-733.
11. Yamada S, Richardson K, Tang M, Halaschek-Wiener J, Cook VJ, Fitzgerald JM, *et al.* Genetic variation in carboxylesterase genes and susceptibility to isoniazid-induced hepatotoxicity. *Pharmacogenomics J* 2010; **10**(6): 524-536.

12. Taylor E, Döpfner M, Sergeant J, Asherson P, Banaschewski T, Buitelaar J, *et al.* European clinical guidelines for hyperkinetic disorder -- first upgrade. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2004; **13 Suppl 1**: 17-30.
13. Schertz M, Adelman AR, Alfieri NE, Bienkowski RS. Predictors of weight loss in children with attention deficit hyperactivity disorder treated with stimulant medication. *Pediatrics* 1996; **98**(4 Pt 1): 763-769.
14. Pliszka S, Issues AWGoQ. Practice parameter for the assessment and treatment of children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2007; **46**(7): 894-921.
15. Graham J, Coghill D. Adverse effects of pharmacotherapies for attention-deficit hyperactivity disorder: epidemiology, prevention and management. *CNS Drugs* 2008; **22**(3): 213-237.
16. Efron D, Jarman F, Barker M. Side effects of methylphenidate and dexamphetamine in children with attention deficit hyperactivity disorder: a double-blind, crossover trial. *Pediatrics* 1997; **100**(4): 662-666.
17. Wigal T, Greenhill L, Chuang S, McGough J, Vitiello B, Skrobala A, *et al.* Safety and tolerability of methylphenidate in preschool children with ADHD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2006; **45**(11): 1294-1303.

18. Zachor DA, Roberts AW, Hodgens JB, Isaacs JS, Merrick J. Effects of long-term psychostimulant medication on growth of children with ADHD. *Res Dev Disabil* 2006; **27**(2): 162-174.
19. Zeni CP, Guimarães AP, Polanczyk GV, Genro JP, Roman T, Hutz MH, *et al.* No significant association between response to methylphenidate and genes of the dopaminergic and serotonergic systems in a sample of Brazilian children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2007; **144B**(3): 391-394.
20. Polanczyk G, Zeni C, Genro JP, Guimarães AP, Roman T, Hutz MH, *et al.* Association of the adrenergic alpha2A receptor gene with methylphenidate improvement of inattentive symptoms in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2007; **64**(2): 218-224.
21. Barkley RA. *Attention-Deficit Hyperactivity Disorder: A handbook for diagnosis and treatment*. New York: Guilford Press, 1990.
22. 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.
23. Lahiri DK, Nurnberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; **19**(19): 5444.

24. Gibbons RD, Hedeker D, Elkin I, Waternaux C, Kraemer HC, Greenhouse JB, *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): 739-750.
25. Mallinckrodt CH, Clark WS, David SR. Accounting for dropout bias using mixed-effects models. *J Biopharm Stat* 2001; **11**(1-2): 9-21.
26. 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): 310-317.
27. Leddy JJ, Epstein LH, Jaroni JL, Roemmich JN, Paluch RA, Goldfield GS, *et al.* Influence of methylphenidate on eating in obese men. *Obes Res* 2004; **12**(2): 224-232.
28. Hammerness P, Georgiopoulos A, Doyle RL, Utzinger L, Schillinger M, Martelon M, *et al.* An open study of adjunct OROS-methylphenidate in children who are atomoxetine partial responders: II. Tolerability and pharmacokinetics. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 2009; **19**(5): 493-499.
29. Barkley RA, McMurray MB, Edelbrock CS, Robbins K. Side effects of methylphenidate in children with attention deficit hyperactivity disorder: a

systemic, placebo-controlled evaluation. *Pediatrics* 1990; **86**(2): 184-192.

30. Sonuga-Barke EJ, Coghill D, Wigal T, DeBacker M, Swanson J. Adverse reactions to methylphenidate treatment for attention-deficit/hyperactivity disorder: structure and associations with clinical characteristics and symptom control. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 2009; **19**(6): 683-690.
31. Stein MA, Sarampote CS, Waldman ID, Robb AS, Conlon C, Pearl PL, *et al.* A dose-response study of OROS methylphenidate in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pediatrics* 2003; **112**(5): e404.
32. Lee J, Grizenko N, Bhat V, Sengupta S, Polotskaia A, Joober R. Relation between therapeutic response and side effects induced by methylphenidate as observed by parents and teachers of children with ADHD. *BMC Psychiatry* 2011; **11**: 70.
33. Davis C, Levitan RD, Kaplan AS, Carter J, Reid C, Curtis C, *et al.* Dopamine transporter gene (DAT1) associated with appetite suppression to methylphenidate in a case-control study of binge eating disorder. *Neuropsychopharmacology* 2007; **32**(10): 2199-2206.
34. Leddy JJ, Waxmonsky JG, Salis RJ, Paluch RA, Gnagy EM, Mahaney P, *et al.* Dopamine-related genotypes and the dose-response effect of methylphenidate on eating in attention-deficit/hyperactivity disorder youths. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 2009; **19**(2): 127-136.

Table 1. Demographic and Clinical Characteristic of the Sample According to the Presence of the G Allele

Characteristic ^a	T homozygous		G allele carriers		P value ^b
	(n=129)		(n=76)		
Age	10.35	± 2.88	10.00	± 3.13	.42
IQ	93.20	± 14.78	93.88	± 13.31	.75
Male	101	78.3%	50	65.8%	.07
Caucasian	101	78.29%	66	86.84%	.09
ADHD Subtypes					.57
Inattentive	35	27.1%	22	28.9%	
Hyperactive	11	8.5%	3	3.9%	
Combined	71	55.0%	46	60.5%	
Subthreshold	12	9.3%	5	6.6%	
Comorbid Condition					
CD	13	10.1 %	13	17.1%	.19
ODD	52	40.3%	33	43.42%	.66
Anxiety disorder	38	29.45%	31	40.8%	.13
Mood Disorder	5	3.88%	2	2.63%	>.99
Appetite reduction baseline score	1.16	± 2.32	1.04	± 1.78	.46
Methylphenidate dose prescribed (mg/kg/day)					
At baseline	.46	± .16	.46	± .12	.60
At first month	.61	± .20	.60	± .16	.75
BSSERS baseline score	35.57	± 24.98	39.78	± 24.44	.18
Concomitant prescription of another medication	6	4.7%	3	3.9%	>.99

ADHD, attention-deficit/hyperactivity disorder; CD, conduct disorder; IQ, intelligence quotient; ODD, oppositional defiant disorder; BSSERS, Barkley Side Effect Rating Scale

^a Data are given as number (percentage) or mean (± standard deviations).

^b Calculated by t test (quantitative variables with normal distribution), Mann-Whitney U test (quantitative variables without normal distribution), and χ^2 test or Fisher exact test (categorical variables)

Table 2. Evaluation of appetite reduction changes in patient who started without it.

	Lowest scores (%) ^a	highest scores (%) ^b	Total (%)
T homozygous	67 (87)	10 (13)	77 (100)
G carriers	27 (65.9)	14 (34.1)	41 (100)
Total (%)	94 (79.7)	24 (21.3)	118 (100)

$p = .009$, OR = 3.474 (95%CI 1.376 - 8.773)

^a appetite reduction scores between 1 - 5

^b appetite reduction scores between 6 - 9

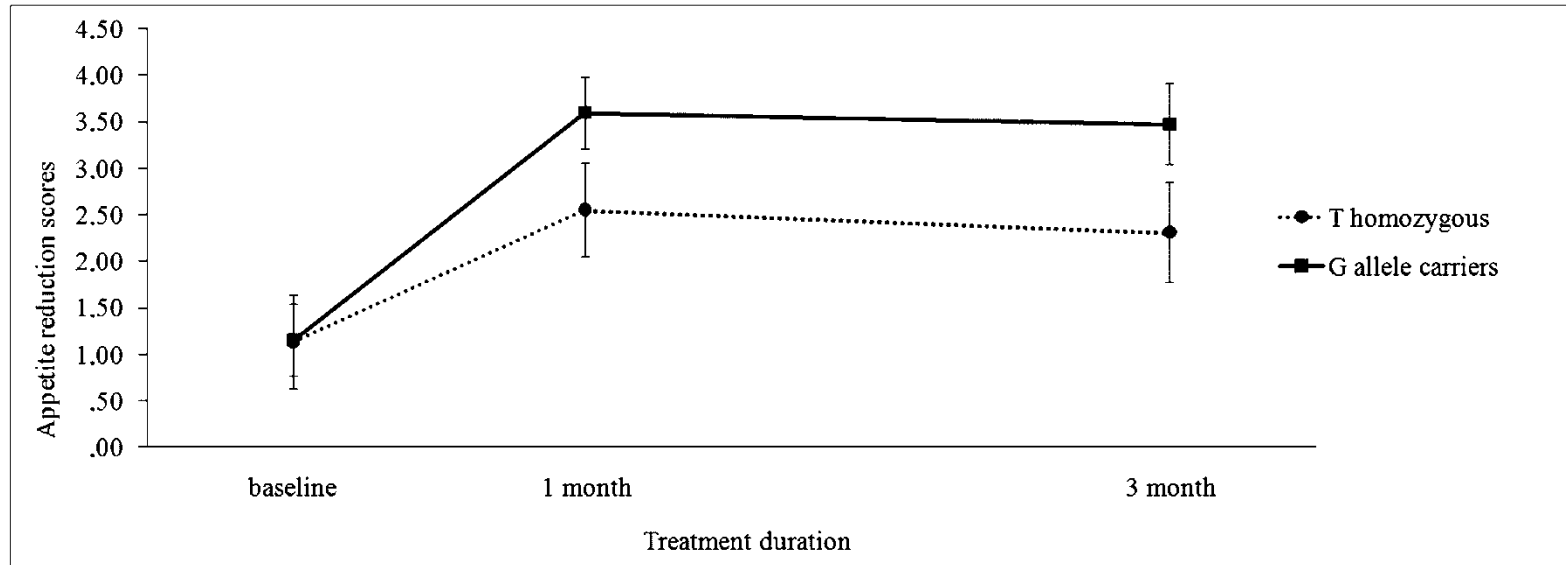


Figure 1. Mean appetite reduction scores during methylphenidate treatment according to *CES1* genotype in a mixed-effects model ($n = 205$). There were effects of treatment over time [$n = 205$; $F(2,270) = 82.07$, $p < .001$], for presence of G allele [$F(1,197) = 4.04$, $p = .046$], and a significant interaction between these factors [$F(2,265) = 3.71$, $p = .026$] on worsening of appetite reduction scores children and adolescents during the treatment with methylphenidate for 3 months.

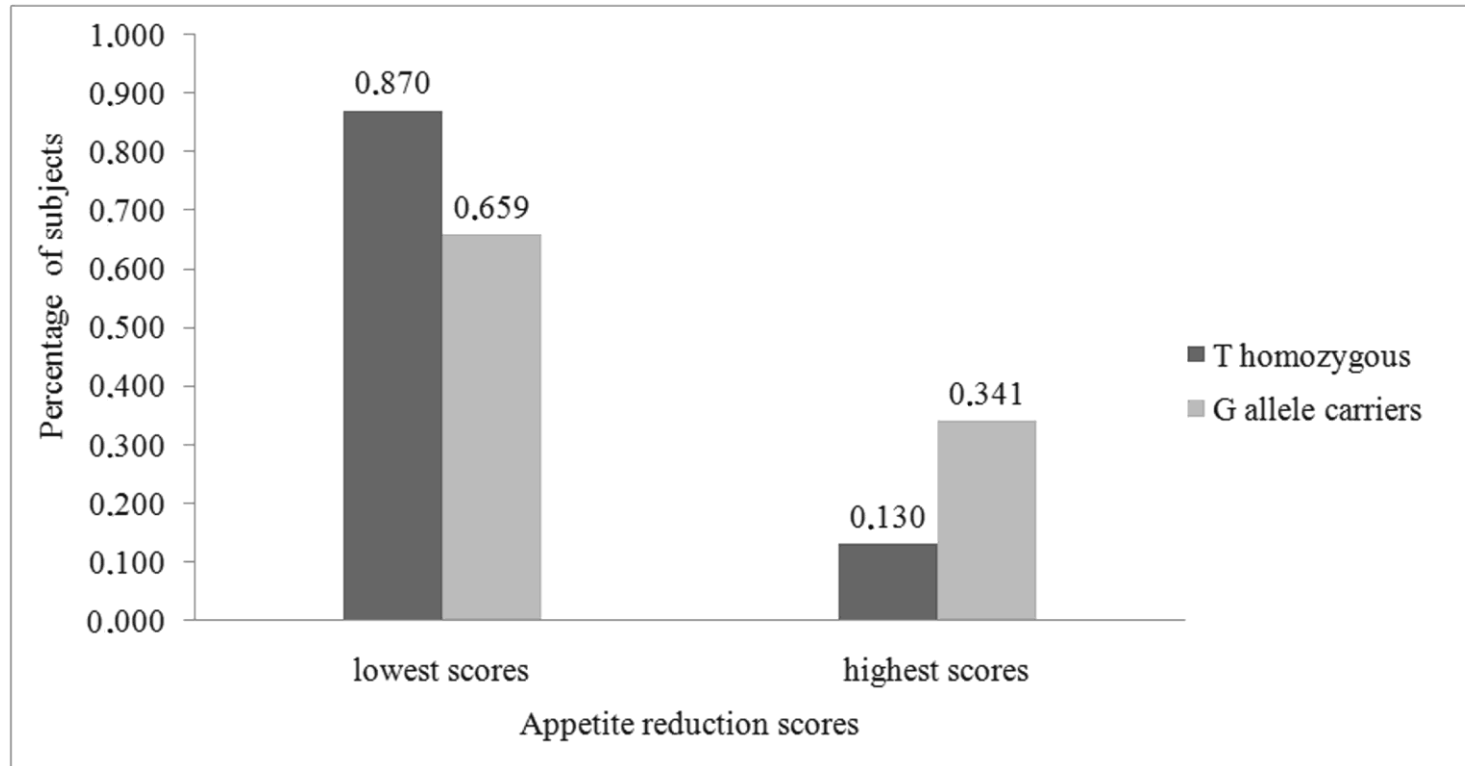


Figure 2. Effect of the presence of the G allele on the changes in appetite reduction scores from baseline to the third month of treatment ($n = 118$). Lowest scores (1-5); highest scores (6-9).

CAPÍTULO IV
DISCUSSÃO

A discussão mais específica referente aos resultados obtidos nesta dissertação foram discutidas no artigo científico (capítulo 3). No presente capítulo serão mencionados alguns aspectos mais gerais deste trabalho e outros que não foram incluídos no artigo.

O trabalho iniciou com a análise de dois polimorfismos da CES1 para verificarmos a resposta farmacogenética do metilfenidato. Entretanto, após a genotipagem do SNP Gly143Glu (rs71647871), resolvemos retirá-lo do nosso estudo, pois as frequências gênicas e genotípicas observadas foram muito baixas na nossa amostra. Entre 230 indivíduos genotipados, apenas seis eram portadores do alelo *Glu* (2,6%). Frequência muito similar à encontrada em indivíduos argentinos saudáveis (1,8%) (Soria *et al.*, 2010); no primeiro estudo que identificou o SNP, a prevalência descrita foi de 7,5% em indivíduos de ancestralidade europeia (Zhu *et al.*, 2008). Em crianças húngaras com TDAH, a frequência foi de 5,8% (Nemoda *et al.*, 2009).

Nemoda *et al.* (2009) relataram a necessidade de doses menores de metilfenidato em portadores do alelo *Glu* do polimorfismo Gly143Glu. De acordo com esses autores havia uma diferença de 0,10 mg/kg/dia entre genótipos. Contudo, é importante enfatizar que a associação foi encontrada em uma amostra muito pequena (5 portadores do polimorfismo versus 90 não-portadores). Com esse tamanho amostral não é possível eliminar o risco de o resultado observado seja decorrente de erro tipo I, onde se obtém um resultado falso-positivo.

Polimorfismos com frequências baixas devem ser estudados em grandes amostras devido ao pequeno efeito fenotípico dessas variantes. A aplicação clínica desses resultados, no entanto seria muito pequena, pois a grande maioria dos indivíduos não seria portadora do alelo de risco. Nesses casos é mais benéfico que os clínicos aumentem e/ou reduzam a dose conforme a resposta dos pacientes ao tratamento.

Como já citado, medicamentos estimulantes são reconhecidos como tratamentos de primeira linha para o TDAH (Spencer *et al.*, 1996). Um estudo

prospectivo de 5 anos demonstrou que mais da metade dos participantes não conseguiu continuar a medicação no segundo ano de tratamento, e muitos daqueles que continuaram o tratamento relataram efeitos adversos clinicamente significativos, dessa forma, os autores concluíram que os efeitos colaterais e tolerabilidade percebida foram fatores importantes na decisão dos pacientes para interromper o tratamento (Charach *et al.*, 2004).

Estudos abertos de acompanhamento de ensaios clínicos demonstraram que menos de 60% dos pacientes medicados com metilfenidato ou anfetamina previamente estabilizados permaneceram em uso de medicação após 12 meses de tratamento, embora aqueles que permaneceram na terapia mostraram melhoras contínuas desde o início do tratamento (McGough *et al.*, 2005; Wilens *et al.*, 2003). Portanto, é evidente que, apesar da eficácia global dos medicamentos estimulantes no alívio a curto prazo dos sintomas de TDAH, existem impedimentos consideráveis para permanecer em tratamento a longo prazo. Embora a maioria dos estudos farmacogenéticos de TDAH publicados têm enfatizado preditores genéticos de melhora dos sintomas, uma aplicação mais prática clínica pode estar na previsão do risco de efeitos adversos e tolerabilidade à medicação. Os efeitos adversos são os principais obstáculos para a adesão ao tratamento em longo prazo.

O presente trabalho tentou ampliar os conhecimentos no campo da farmacogenética do TDAH ao tentar investigar a resposta terapêutica relacionada ao gene responsável pela enzima de metabolização do metilfenidato. A hipótese de que as variações no gene *CES1* poderiam contribuir para o desenvolvimento de efeitos adversos em crianças e adolescentes com TDAH devido à utilização do fármaco, nos levou à seleção do polimorfismo baseado em um único trabalho em que os autores demonstram tendência à hepatotoxicidade pela utilização de isoniazida em pacientes com tuberculose (Yamada *et al.*, 2010). Com sucesso, nossa hipótese se confirmou ao revelar que o polimorfismo -75 T>G estava associado com escores mais altos de redução de apetite, o efeito adverso mais relatado ao uso de MFD. Esses resultados são clinicamente importantes, pois a supressão de apetite induz a uma ingestão calórica reduzida e nutrição de qualidade inferior que são as prováveis causas de retardo de crescimento, um dos maiores efeitos adversos em longo prazo

associados com a terapia estimulante (Swanson *et al.*,2007).

Biologicamente, ainda é incerto o real papel do polimorfismo -75 T>G devido à falta de estudos funcionais e mais trabalhos que o utilizem. Contudo, nós sugerimos que ele teria um efeito na regulação do gene por estar localizado na região 5' UTR. Com um olhar mais observador na região promotora dos genes *CES1A1* e *CES1A2*. O polimorfismo se localiza muito próximo ao sítio de ligação do fator de transcrição Sp1-B no gene *CES1A1*, que não ocorre no gene *CES1A2*. Importante observar, que *CES1A2* tem menor expressão que *CES1A1* por este apresentar um sítio de ligação a mais a Sp1 e o sítio de ligação ao C/EBP. Conforme os autores, na posição -75 do gene *CES1A2*, o nucleotídeo presente é uma guanina, a forma variante do polimorfismo estudado (Hokosawa *et al.* 2008). Em uma perspectiva de continuação desse estudo, seria necessário investigar se o polimorfismo -75 T>G poderia estar modificando a conformação do sítio de ligação ao Sp1 ou se ele estaria em desequilíbrio de ligação com os nucleotídeos variantes da região para que possamos inferir a sua verdadeira função no gene. Pois, se *CES1A2* possui o nucleotídeo G na posição -75, isso estaria de alguma forma impedindo a ligação com Sp1, diminuindo a sua expressão no fígado. Essa poderia ser a explicação para os resultados encontrados com a *CES1A1*. Assim, os pacientes que possuem a variante G teriam uma diminuição da atividade enzimática pela menor expressão, aumentando a biodisponibilidade de metilfenidato e a propensão a efeitos adversos.

A aplicação clínica mais promissora da farmacogenética e farmacogenômica do TDAH pode estar no desenvolvimento de novos tratamentos para o TDAH. A identificação de genes que determinam a suscetibilidade ao TDAH ou que preveem a resposta ao tratamento podem promover a descoberta de novos alvos terapêuticos para desenvolvimento farmacêutico futuro. Em última análise, espera-se que este tipo de pesquisa possa permitir aos médicos adaptar as opções de tratamento individual com base no genótipo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abikoff H, Jensen P, Arnold LE, Hoza B, Hechtman L, Pollack S, Martin D, Alvir J, March JS, Hinshaw SP, *et al.* (2002) Observed classroom behavior of children with ADHD: Relationship to gender and comorbidity. *J Abnorm Child Psychol* 30(4):349–359.

Aman MG, Arnold LE, Ramadan Y, Witwer A, Lindsay R, McDougle CJ, Posey DJ, Swiezy N, Kohn A, McCracken JT, *et al.* (2005) Randomized, controlled, crossover trial of methylphenidate in pervasive developmental disorders with hyperactivity. *Arch Gen Psychiatry* 62:1266–1274.

American Psychiatric Association (1994) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Diseases (DSM-IV)*, 4th ed. Washington, DC, American Psychiatric Publishing.

Arcia E, Conners CK (1998) Gender differences in ADHD? *J Dev Behav Pediatr.* 19(2):77-83.

Banerjee TD, Middleton F, Faraone SV (2007) Environmental risk factors for attention-deficit hyperactivity disorder. *Acta Paediatr.* 96(9):1269-74.

Barkley RA (1990) *Attention-deficit hyperactivity disorder: A handbook for diagnosis and treatment.* New York: Guilford Press.

Barkley RA (1997) Behavioral inhibition, sustained attention, and executive functions: constructing a unifying theory of ADHD. *Psychol Bull.* 121(1):65-94.

Barkley RA (2002) Major life activity and health outcomes associated with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J. Clin. Psychiatry* 63 (Suppl. 12), 10-12.

Beaumont, K., Webster, R., Gardner, I., and Dack, K. (2003) Design of ester prodrugs to enhance oral absorption of poorly permeable compounds: Challenges to the discovery scientist. *Curr. Drug Metab.* 4, 461–485.

Bencharit S, Morton CL, Xue Y, Potter PM, Redinbo MR. (2003) Structural basis of heroin and cocaine metabolism by a promiscuous human drug-processing enzyme. *Nat Struct Biol.* 10(5): 349-56.

Berry CA, Shaywitz SE, Shaywitz BA (1985) Girls with attention deficit disorder: A silent minority? A report on behavioral and cognitive characteristics. *Pediatrics* 76(5):801–809.

Biederman J, Faraone SV (2005) Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet* 366:237–248

Biederman J, Kim JW, Doyle AE, Mick E, Fagerness J, Smoller JW, Faraone SV (2008) Sexually dimorphic effects of four genes (COMT, SLC6A2, MAOA, SLC6A4) in genetic associations of ADHD: a preliminary study. *Am J Med Genet B* 147B:1511– 1518

Biederman J, Mick E, Faraone SV, Braaten E, Doyle AE, Spencer T, Wilens TE, Frazier E, Johnson MA (2002) Influence of gender on attention deficit hyperactivity disorder in children referred to a psychiatric clinic. *Am J Psychiatry* 159(1):36–42.

Biederman J, Milberger S, Faraone SV, Kiely K, Guite J, Mick E, Ablon S, Warburton R and Reed E (1995) Family-environment risk factors for attention-deficit hyperactivity disorder. A test of Rutter's indicators of adversity. *Arch Gen Psychiatry* 52: 464-4670.

Bobb AJ, Addington AM, Sidransky E, Gornick MC, Lerch JP, Greenstein DK, Clasen LS, Sharp WS, Inoff-Germain G, Wavrant-De Vrièze F, *et al.* (2005) Support for association between ADHD and two candidate genes: NET1 and DRD1. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 134(1):67–72.

Breen MJ, Altepeter TS (1990) Situational variability in boys and girls identified as ADHD. *J Clin Psychol* 46(4):486–490

Cardinal RN, Winstanley CA, Robbins TW, Everitt BJ (2004) Limbic corticostriatal systems and delayed reinforcement. *Ann N Y Acad Sci.* 1021:33-50

Castellanos FX, Lee PP, Sharp W, Jeffries NO, Greenstein DK, Clasen LS, Blumenthal JD, James RS, Ebens CL, Walter JM, *et al.* (2002) Developmental trajectories of brain volume abnormalities in children and adolescents with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *JAMA* 288: 1740-1748.

Charach A, Ickowicz A, Schachar R (2004). Stimulant treatment over five years; Adherence, effectiveness, and adverse events. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 43:559–567

Chen J, Lipska BK, Halim N, Ma QD, Matsumoto M, Melhem S, Kolachana BS, Hyde TM, Herman MM, Apud J, *et al.* (2004) Functional analysis of genetic variation on catechol-O-methyltransferase (COMT): Effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. *Am J Hum Genet* 75: 807-821.

Cheon K, Cho D, Koo M, Song D, Namkoong K (2009) Association between homozygosity of a G allele of the α -2a-adrenergic receptor gene and methylphenidate response in Korean children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol. Psychiatry* 65(7), 564–570.

Cheuk DK and Wong V (2006) Meta-analysis of association between a catechol-O-methyltransferase gene polymorphism and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Behav Genet* 36:651-659.

da Silva T, Pianca T, Roman T, Hutz MH, Faraone SV, Schmitz M, Rohde LA (2008) Adrenergic α 2A receptor gene and response to methylphenidate in attention-deficit/hyperactivity disorder-predominantly inattentive type. *J. Neural. Transm.* 115(2): 341–345.

Davids E, Zhang K, Tarazi FI, Baldessarini RJ (2003) Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. *Brain Res Brain Res Rev.* 42(1):1-21.

Efron D, Jarman F, Barker M (1997) Side Effects of methylphenidate and dexamethylphenidate etamine in children with attention déficit hyperactivity disorder: A double-blind, crossover trial. *Pediatrics* 100:662–666.

Eiraldi RB, Power TJ, Nezu CM (1997) Patterns of comorbidity associated with subtypes of attention-deficit/hyperactivity disorder among 6- to 12- yearold children. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 36:503–514.

Evans WE, McLeod HL (2003) Pharmacogenomics-drug disposition, drug targets, and side effects, *N. Engl. J. Med.* 348 538–549.

Faraone S, Perlis R, Doyle A, Smoller J, Goralnick J, Holmgren M, Sklar P (2005) Molecular genetics of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Biol Psychiatry* 57:1313–1323

Faraone SV and Biederman J (1998) Neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 44: 951-958.

Faraone SV, Biederman J, Keenan K, Tsuang MT (1991) A family-genetic study of girls with DSM-III attention deficit disorder. *Am J Psychiatry* 148(1):112–117.

Faraone SV, Doyle AE, Mick E, Biederman J (2001) Meta-analysis of the association between the 7-repeat allele of the dopamine D(4) receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* 158: 1052–1057.

Fayyad J, De Graaf R, Kessler R, Alonso J, Angermeyer M, Demyttenaere K, De Girolamo G, Haro JM, Karam EG, Lara C, *et al.* (2007) Cross-national prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder. *Br. J. Psychiatry* 190, 402–409.

Gatley SJ, Pan D, Chen R, Chaturvedi G and Ding YS (1996) Affinities of methylphenidate derivatives for dopamine, norepinephrine and serotonin transporters. *Life Sci* 58:231–239.

Genro JP, Kieling C, Rohde LA, Hutz MH (2010) Attention-deficit/hyperactivity disorder and the dopaminergic hypotheses. *Expert Rev Neurother.* 10(4):587-601.

Gizer I, Ficks C, Waldman I (2009) Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum. Genet.* 126(1): 51–90.

Graham J, Coghill D (2008) Adverse effects of pharmacotherapies for attention-deficit hyperactivity disorder—Epidemiology, prevention and management. *CNS Drugs* 22:213–237.

Greenhill LL, Swanson JM, Vitiello B, Davies M, Clevenger W, Wu M, Arnold LE, Abikoff HB, Bukstein OG, Conners CK, *et al.* (2001) Impairment and deportment responses to different methylphenidate doses in children with ADHD: The MTA titration trial. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 40:180–187.

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

Horn W, Wagner A, Ialongo N (1989) Sex differences in school-aged children with pervasive attention deficit hyperactivity disorder. *J Abnorm Child Psychol* 17(1):109–125.

Hosokawa M (2008). Structure and catalytic properties of carboxylesterase isozymes involved in metabolic activation of prodrugs *Molecules*.13(2):412-31.

Hosokawa M, Furihata T, Yaginuma Y, Yamamoto N, Watanabe N, Tsukada E, Ohhata Y, Kobayashi K, Satoh T, Chiba K (2008). Structural organization and characterization of the regulatory element of the human carboxylesterase (CES1A1 and CES1A2) genes. *Drug Metab Pharmacokinet.* 23(1):73-84.

Imai, T (2006). Human carboxylesterase isozymes: catalytic properties and rational drug design. *Drug. Metab. Pharmacokinet* 21(3):173-185.

Kadesjö B and Gillberg C (1999) Developmental coordination disorder in Swedish 7-year-old children. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 38(7):820-8.

Karabekiroglu K, Yazgan YM, Dedeoglu C (2008) Can we predict shortterm side effects of methylphenidate immediate-release? *J Child Psychol Psychiatry.* 49(1):48–54.

Kieling C, Goncalves R, Tannock R, Castellanos F (2008) Neurobiology of attention deficit hyperactivity disorder. *Child. Adolesc. Psychiatr. Clin. N. Am.* 17(2), 285–307.

Kirley A, Lowe N, Hawi Z, Mullins C, Daly G, Waldman I, McCarron M, O'Donnell D, Fitzgerald M, Gill M, *et al.* (2003) Association of the 480 bp DAT1 allele with methylphenidate response in a sample of Irish children with ADHD. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr Genet* 121B(1): 50–54.

Laizure SC, Mandrell T, Gades NM, Parker RB (2003) Cocaine metabolism and interaction with cocaine and ethanol: Role of carboxylesterases. *Drug Metab. Dispos.* 31, 16–20.

Langmann T, Becker A, Aslanidis C, Notka F, Ullrich H, Schwer H, Schmitz G (1997) Structural organization and characterization of the promoter region of a human carboxylesterase gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1350 (1): 65– 74.

Lawson DC, Turic D, Langley K, Pay HM, Govan CF, Norton N, Hamshere ML, Owen MJ, O'Donovan MC, Thapar A, *et al.* (2003) Association analysis of monoamine oxidase A and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet* 116(1):84–9.

Leddy JJ, Waxmonsky JG, Salis RJ, Paluch RA, Gnagy EM, Mahaney P, Erbe R, Pelham WE, Epstein LH (2009) Dopamine-related genotypes and the dose–response effect of methylphenidate on eating in attention-deficit/hyperactivity disorder youths. *J Child Adolesc Psychopharmacology* 19:127–136.

Lucki I (1998) The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol Psychiatry* 44:151–162.

Maedgen JW, Carlson CL (2000) Social functioning and emotional regulation in the attention deficit hyperactivity disorder subtypes. *J Clin Child Adolesc Psychol* 29:30–42.

Markowitz JS, and Patrick KS (2008) Differential pharmacokinetics and pharmacodynamics of methylphenidate enantiomers: Does chirality matter? *J. Clin. Psychopharmacol.* 28, S54–S61.

Markowitz JS, Straughn AB, and Patrick KS (2003) Advances in the pharmacotherapy of attention-deficit-hyperactivity disorder: focus on methylphenidate formulations. *Pharmacotherapy* 23:1281–1299.

Marsh S, Xiao M, Yu, J, Ahluwalia R, Minton M, Freimuth R, Kwok PY, McLeod HL (2004) Pharmacogenomic assessment of carboxylesterases 1 and 2. *Genomics* 84; 661-668.

Masellis M, Basile V, Muglia P, Ozdemir V, Macciardi FM, Kennedy JL. Psychiatric pharmacogenetics: Personalizing psychostimulant therapy in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Behav Brain Res* 2002;130:85–90.

McGough J, McCracken J, Swanson J, Riddle M, Kollins S, Greenhill L, Abikoff H, Davies M, Chuang S, Wigal T, *et al.* (2006) Pharmacogenetics of methylphenidate response in preschoolers with ADHD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatr* 45:1314–1322.

McGough JJ, Biederman J, Wigal S, Lopez FA, McCracken JT, Spencer T, Zhang Y, Tulloch SJ (2005) Long-term tolerability and effectiveness of once-daily mixed amphetamine salts (Adderall XR) in children with ADHD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 44:530–538

Mick E, Biederman J, Faraone SV, Sayer J and Kleinman SE (2002) Case-control study of ADHD and maternal smoking, alcohol use, and drug use during the pregnancy. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 41: 378-385.

Nemoda Z, Angyal N, Tarnok Z, Gadoros J, Sasvari-Szekely M (2009) Carboxylesterase 1 gene polymorphism and methylphenidate response in ADHD. *Neuropharmacology*. 57(7-8):731-3.

Nigg JT and Goldsmith HH (1998) Developmental psychopathology, personality, and temperament: Reflections on recent behavioral genetics research. *Hum Biol* 70: 387-412.

Patrick KS, Caldwell RW, Ferris RM, and Breese GR (1987) Pharmacology of the

enantiomers of threo-methylphenidate. *J Pharmacol Exp Ther* 241:152–158.

Patrick KS, Straughn AB, Minhinnett RR, Yeatts SD, Herrin AE, DeVane CL, Malcolm R, Janis GC, Markowitz JS, *et al.* (2007) Influence of ethanol and gender on methylphenidate pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther* 81:346–353.

Pindel EV, Kedishvili NY, Abraham TL, Brzezinski MR, Zhang J, Dean RA, and Bosron WF (1997) Purification and cloning of a broad substrate specificity human liver carboxylesterase that catalyzes the hydrolysis of cocaine and heroin. *J Biol Chem* 272:14769–14775.

Pliszka R (1989) Effect of anxiety on cognition, behavior, and stimulant response in ADHD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatr* ;28:882–887.

Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, Biederman J, Rohde LA (2007a) The worldwide prevalence of ADHD: A systematic review and metaregression analysis. *Am. J. Psychiatry* 164(6), 942 – 948.

Polanczyk G, Zeni C, Genro JP, Guimarães AP, Roman T, Hutz MH and Rohde LA (2007b) Association of the Adrenergic α 2A Receptor Gene With Methylphenidate Improvement of Inattentive Symptoms in Children and Adolescents With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Arch Gen Psychiatry* 64:218-224.

Qian Q, Wang Y, Zhou R, Li G, Wang B and Glatt S (2003) Family-based and case-control association studies of catechol-O-methyltransferase in attention deficit hyperactivity disorder suggest genetic sexual dimorphism. *Am J Med Genet* 118B:103-109.

Rapport MD, Kofler MJ, Coiro MM, Raiker JS, Sarver DE, Alderson M (2008) Unexpected effects of methylphenidate in attention-deficit/hyperactivity disorder reflect decreases in core/secondary symptoms and physical complaints common to all children. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 18:237–247.

Redinbo MR, Bencharit S, Potter PM (2003) Human carboxylesterase 1: From drug metabolism to drug discovery. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 620–624.

Redinbo MR and Potter PM (2005). Mammalian carboxylesterases: from drug targets to protein therapeutics. *Drug Discov. Today*, 10, 313–325.

Rohde LA, Barbosa G, Tramontina S and Polanczyk G (2000) Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade. *Rev Bras Psiquiatr* 22:7-11.

Rohde LA, Biederman J, Busnello EA, Zimmermann H, Schmitz M, Martins S, Tramontina S (1999) ADHD in a school sample of Brazilian adolescents: a study of prevalence, comorbid conditions and impairments. *J Am Acad Child Adolesc Psychiat*, 38:716-22.

Roman T, Schmitz M, Polanczyk GV, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH (2002) Further evidence for the association between attention- deficit/hyperactivity disorder and the dopamine-beta-hydroxylase gene. *Am J Med Genet* 114(2):154–8.

Roman T, Szobot C, Martins S, Biederman J, Rohde L, Hutz M (2002) Dopamine transporter gene and response to methylphenidate in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pharmacogenetics* 12(6): 497–499.

Sanghani SP, Quinney SK, Fredenburg TB, Davis WI, Murry DJ, and Bosron WF (2004) Hydrolysis of irinotecan and its oxidative metabolites, 7-ethyl-10-[4-N-(5-aminopentanoic acid)-1-piperidino] carbonyloxycamptothecin and 7-ethyl-10-[4-1-piperidino)-1-amino]-carbonyloxycamptothecin, by human carboxylesterases CES1A1, CES2, and a newly expressed carboxylesterase isoenzyme, CES3. *Drug Metab Dispos* 32:505–511.

Sanghani SP, Sanghani PC, Schiel MA, Bosron WF (2009). Human carboxylesterases: an update on CES1, CES2 and CES3. *Protein Pept Lett* 16(10):1207-14.

Satoh T, Hosokawa M (1998) The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38: 257– 288.

Satoh T, Taylor P, Bosron WF, Sanghani SP, Hosokawa M, and La Du BN (2002) Current progress on esterases: from molecular structure to function. *Drug Metab Dispos* 30:488–493.

Satterfield JH, Dawson ME (1971) Electrodermal correlates of hyperactivity in children. *Psychophysiology* 8(2):191-7.

Shaffer D, Gould MS, Brasic J, Ambrosini P, Fisher P, Bird H, Aluqahlia S (1983) A children's global assessment scale (CGAS). *Arch Gen Psychiatry* 40: 1228-1231.

Smith KM, Daly M, Fischer M, Yiannoutsos CT, Bauer L, Barkley R, Navia BA (2003) Association of the dopamine beta hydroxylase gene with attention deficit hyperactivity disorder: Genetic analysis of the Milwaukee longitudinal study. *Am J Med Genet* 119(1):77–85.

Solanto MV (2002) Dopamine dysfunction in AD/HD: integrating clinical and basic neuroscience research. *Behavioural Brain Research* 130:65-71.

Sonuga-Barke EJ, Coghill D, Wigal T, DeBacker M, Swanson J (2009) Adverse reactions to methylphenidate treatment for attention-deficit/hyperactivity disorder: structure and associations with clinical characteristics and symptom control. *J Child Adolesc Psychopharmacol.* 19(6):683-90.

Spencer T, Biederman J, Wilens T, Harding M, O'Donnell D, Griffin S (1996) Pharmacotherapy of attention deficit hyperactivity disorder across the lifespan. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 35:409–428

Spencer TJ (2004) ADHD treatment across the life cycle. *J. Clin. Psychiatry* 65 (Suppl3) 22 -22.

Spivak B, Vered Y, Yoran-Hegesh R, Averbuch E, Mester R, Graf E, Weizman A (1999) Circulatory levels of catecholamines, serotonin and lipids in attention deficit hyperactivity disorder. *Acta Psychiatr Scand* 99:300–304

Srinivas NR, Hubbard JW, and Midha KK (1990) Enantioselective gas

chromatographic assay with electron-capture detection for dl-ritalinic acid in plasma. *J Chromatogr* 530:327–336.

Srinivas NR, Hubbard JW, Korchinski ED, and Midha KK (1992a) Stereoselective urinary pharmacokinetics of dl-threo-methylphenidate and its major metabolite in humans. *J Pharm Sci* 81:747–749.

Srinivas NR, Hubbard JW, Quinn D, and Midha KK (1992b) Enantio-selective pharmacokinetics and pharmacodynamics of dl-threo-methylphenidate in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Clin Pharmacol Ther* 52:561–568.

Stein M, McGough J (2008) The pharmacogenomic era: promise for personalizing attention deficit hyperactivity disorder therapy. *Child. Adolesc. Psychiatr. Clin. N. Am.* 17(2), 475–490.

Stein M, Waldman I, Sarampote C, Seymour KE, Robb AS, Conlon C, Kim SJ, Cook EH (2005) Dopamine transporter genotype and methylphenidate dose response in children with ADHD. *Neuropsychopharmacology* 30(7): 1374–1382.

Stein MA, Sarampote CS, Waldman ID, Robb AS, Conlon C, Pearl PL, Black DO, Seymour KE, Newcorn JH (2003) A dose-response study of OROS methylphenidate in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pediatrics* 112:404–E413.

Stein MA, Waldman ID, Sarampote CS, Seymour KE, Robb AS, Conlon C, Kim SJ, Cook EH (2005) Dopamine transporter genotype and methylphenidate dose response in children with ADHD. *Neuropsychopharmacology* 30:1374–1382.

Sun Z, Murry DJ, Sanghani SP, Davis WI, Kedishvili NY, Zou Q, Hurley TD, and Bosron WF (2004) Methylphenidate is stereoselectively hydrolyzed by human carboxylesterase CES1A1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310, 469–476.

Swanson JM, Elliott GR, Greenhill LL, Wigal T, Arnold LE, Vitiello B, Hechtman L, Epstein JN, Pelham WE, Abikoff HB, *et al.* (2007) Effects of stimulant medication on growth rates across 3 years in the MTA follow-up. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 46(8):1015-27.

Swanson JM, Kraemer HC, Hinshaw SP (2001) 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.

Swanson JM., Castellanos FX, Murias M, La Hoste G, Kennedy J (1998a) Cognitive neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorder and hyperkinetic disorder. *Curr Opin Neurobiology* 8: 263-271

Swanson JM., Posner Mi Cantwell D, Wigal S, Crinella F, Filipek P (1998b) Attention-deficit/hyperactivity disorder: symptom domains, cognitive processes and neural networks. In: ParasurGhuman, R. (Ed.), *The Attentive Brain*. MIT Press, Cambridge, MA, pp. 445-460.

Tahir E, Yazgan Y, Cirakoglu B, Ozbay F, Waldman I, Asherson P (2000) Association and linkage of DRD4 and DRD5 with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in a sample of Turkish children. *Mol. Psychiatry* 5(4): 396–404.

Taylor EA, Dopfner M, Sergeant J, Asherson P, Banaschewski T, Buitelaar J, Coghill D, Danckaerts M, Rothenberger A, Sonuga-Barke E, Steinhausen HC, Zuddas A (2004) European Guidelines for Hyperkinetic Disorder— first upgrade. *European Child & Adolescent Psychiatry* 13(Suppl 1):7–30.

Thapar A, Holmes J, Poulton K and Harrington R (1999) Genetic bases of attention-deficit and hyperactivity. *Br J Psychiatry* 174: 105-111.

Thapar A, Langley K, Asherson P and Gill M (2007) Gene-environment interplay in attention-deficit hyperactivity disorder and the importance of a developmental perspective. *Br J Psychiatry* 190: 1-3.

Van der Kooij MA and Glennon JC (2007) Animal models concerning the role of dopamine in attention-deficit hyperactivity disorder. *Neurosci Biobehav Rev.*31(4):597-618.

Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Logan J, Gerasimov M, Maynard L, Ding YS, Gatley SJ, Gifford A, and Franceschi D (2001) Therapeutic doses of oral

methylphenidate significantly increase extracellular dopamine in the human brain. *J Neurosci* 21:1–5.

Weber P, Bubl R, Lutschg J (2003) Side effects of methylphenidate in children. Prevalence and associated factors. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 151:399–404.

Wender PH, Epstein RS, Kopin IJ, Gordon EK (1971) Urinary monoamine metabolites in children with minimal brain dysfunction. *Am J Psychiatry*. 127(10):1411-5.

Wigal T, Greenhill L, Chuang S, McGough J, Vitiello B, Skrobala A, Swanson J, Wigal S, Abikoff H, Kollins S, *et al.* (2006) Safety and tolerability of methylphenidate in preschool children with ADHD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 45:1294–1302.

Wigg K, Zai G, Schachar R, Roberts W, Malone M, Kennedy JL, Barr CL. (2002) Attention deficit hyperactivity disorder and the gene for dopamine Beta-hydroxylase. *Am J Psychiatry* 159(6):1046–8.

Wilens T, Pelham W, Stein M, Conners CK, Abikoff H, Atkins M, August G, Greenhill L, McBurnett K, Palumbo D, *et al.* (2003) ADHD treatment with oncedaily OROS methylphenidate: interim 12-month results from a long-term open-label study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 42:424–433.

Winsberg B and Comings D (1999) Association of the dopamine transporter gene (DAT1) with poor methylphenidate response. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 38(12): 1474–1477.

Yamada S, Richardson K, Tang M, Halaschek-Wiener J, Cook VJ, Fitzgerald JM, Elwood K, Marra F, Brooks-Wilson A (2010) Genetic variation in carboxylesterase genes and susceptibility to isoniazid-induced hepatotoxicity. *Pharmacogenomics* J 1–13

Zeni CP, Guimarães AP, Polanczyk GV, Genro JP, Roman T, Hutz MH, Rohde LA (2007) No significant association between response to methylphenidate and genes of the dopaminergic and serotonergic systems in a sample of Brazilian children with

attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 144B(3):391-4.

Zhu HJ, Patrick KS, Yuan HJ, Wang JS, Donovan JL, DeVane CL, Malcolm R, Johnson JA, Youngblood GL, Sweet DH, *et al.* (2008) Two CES1 gene mutations lead to dysfunctional carboxylesterase 1 activity in man: clinical significance and molecular basis. *Am. J. Hum. Genet.* 82 (6): 1241–1248.

Zoroglu SS, Erdal ME, Alasehirli B, Erdal N, Sivasli E, Tutkun H Savaş HA, Herken H. (2002): Significance of serotonin transporter gene 5-HTTLPR and variable number of *tandem* repeat polymorphism in attention deficit hyperactivity disorder. *Neuropsychobiology* 45:176 –181.