

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**Instituto de Biociências**  
**Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular**

**O POLIMORFISMO *Val*<sup>158</sup>*Met* DO GENE *COMT* E TDAH: UM ESTUDO DE  
SUSCETIBILIDADE GENÉTICA E FARMACOGENÉTICA.**

**ANGÉLICA SALATINO DE OLIVEIRA**

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

**Orientadora: Dra. Mara Helena Hutz**

Porto Alegre, março de 2011.

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCEADORAS**

---

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios 114 e 116 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), pelo programa Instituto do Milênio e Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX, Brasil) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Brasil).

O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) é uma doença psiquiátrica de etiologia complexa, muito comum em crianças e adolescentes. Caracteriza-se pelos sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade, além de uma alta taxa de comorbidade com transtornos disruptivos do comportamento. Em relação a sua neurobiologia, uma hipótese atualmente aceita é de que crianças com TDAH apresentam um déficit funcional significativo do córtex pré-frontal, com um aparente desequilíbrio de catecolaminas. A enzima Catecol-O-metiltransferase (COMT) atua na degradação de catecolaminas na fenda sináptica e é responsável pela maior parte da degradação de dopamina no córtex pré-frontal. Dessa forma, esta enzima age diretamente no balanço dopaminérgico e noradrenérgico. O polimorfismo *Val<sup>158</sup>Met* do gene *COMT* ocasiona uma troca de aminoácidos, afetando sua termoestabilidade enzimática. Estudos indicam que esta variação enzimática da COMT tem um papel relevante na heterogeneidade fenotípica encontrada no TDAH, podendo estar envolvida no surgimento de transtornos disruptivos do comportamento. Em relação ao tratamento, o fármaco comumente prescrito é o metilfenidato. Este medicamento parece agir diretamente no aumento dos níveis de catecolaminas na fenda sináptica, através do bloqueio do transportador de dopamina e de noradrenalina. Devida a ação direta da COMT na degradação de catecolaminas e a importância do nível desses neurotransmissores na melhora da sintomatologia do TDAH, faz-se também necessário o conhecimento sobre o possível efeito farmacogenético do gene no transtorno.

Um total de 473 crianças foram genotipadas para o polimorfismo *Val<sup>158</sup>Met*. O diagnóstico de TDAH e suas comorbidades foi realizado através de três estágios, previamente descrito na literatura. Dentre esses pacientes, 251 satisfizeram os critérios de inclusão para participar do estudo farmacogenético. Variáveis que poderiam atuar como potenciais confundidores foram analisadas. 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 sintomas foi baseada na Escala de Swanson, Nolan e

Pelham versão IV, e aplicada pelos psiquiatras (sem o conhecimento dos genótipos dos pacientes) antes do tratamento e no primeiro e terceiro mês de tratamento.

Pacientes com o genótipo *Val/Val* mostraram uma taxa 12% maior de transtornos disruptivos do comportamento quando comparados com indivíduos portadores do alelo *Met* ( $\chi^2 = 5,729$ ,  $p = 0,017$ , OR = 1,62). De acordo com o teste farmacogenético, foi encontrado um efeito significativo do tempo de tratamento ( $n = 112$ ;  $F_{2,231} = 5,35$ ,  $p = 0,005$ ) e do gene *COMT* ( $F_{1,148} = 5,02$ ,  $p = 0,027$ ) na melhora clínica dos escores de oposição. Além disso, também foi vista uma interação significativa entre a presença do alelo *Met* e o tempo de tratamento nos escores de oposição nesse período ( $F_{2,229} = 6,40$ ,  $p = 0,002$ ).

Nossos resultados indicam que existe uma diferença significativa na presença de transtorno disruptivo do comportamento em crianças com TDAH, de acordo com o genótipo do polimorfismo *Val<sup>158</sup>Met*. O genótipo *Val/Val* parece predizer a presença desse comportamento antissocial em crianças com TDAH. Além disso, nosso estudo farmacogenético mostrou um efeito prejudicial do genótipo *Val/Val* na melhora clínica dos sintomas de oposição em meninos com TDAH tratados com metilfenidato.

## ABSTRACT

---

Attention-Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) is a common psychiatric condition that affects children and adolescents worldwide. This disorder is defined by symptoms of inattention and hyperactivity/impulsivity. Comorbidity with other disorders, such as Disruptive Behaviour Disorders (DBD) is very common. Regarding ADHD's neurobiology, there is a hypothesis that children with ADHD have prefrontal cortex (PFC) deficits with inadequate catecholamine transmission. The enzyme catechol-O-methyltransferase (COMT) degrades catecholamines and it has been suggested that it plays a key role in prefrontal cortical functioning. COMT accounts for most of the degradation of dopamine in the PFC. The *Val<sup>158</sup>Met* polymorphism is functional. It affects the thermostability of the protein. Several studies suggest that this variation in COMT has a relevant role in ADHD heterogeneity, and it can lead to emergence of DBD. Methylphenidate (MPH) is the most widely used drug to treat ADHD. The effect of MPH on catecholaminergic pathways results in an improvement of the PFC functioning by blockade of dopamine and norepinephrine transporters. Due to action of COMT in catecholaminergic balance, it is necessary to know about the pharmacogenetic effect of *COMT* in ADHD.

A sample of 473 children with ADHD was genotyped for the *Val<sup>158</sup>Met* polymorphism. A consensus diagnosis of ADHD with or without comorbidity was achieved through a three-stage process, as previously described in the literature. Around these patients, 251 children with ADHD fulfilled inclusion criteria to participate in the pharmacogenetic study. Potential confounders were evaluated. 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 outcome measure was the parent-rated oppositional subscale of the Swanson, Nolan and Pelham Scale – version IV. The scale was applied by child psychiatrists blinded to genotype at baseline and in the first and third months.

Patients homozygous for *Val* allele showed a higher frequency of DBD (+ 12%) than *Met* allele carriers ( $\chi^2 = 5.729$ ,  $p = 0.017$ , OR = 1.62). We detected

significant improvement in SNAP-IV oppositional scores from baseline to the first and three months of treatment ( $n = 112$ ;  $F_{2,231} = 5.35$ ,  $p = 0.005$ ). A significant effect of the presence of *Met* allele during three months of treatment ( $F_{1,148} = 5.02$ ,  $p = 0.027$ ), and a significant interaction between the *Met* allele and treatment over time for the SNAP-IV oppositional scores during this period of treatment ( $F_{2,229} = 6.40$ ,  $p = 0.002$ ) were both observed.

Therefore, our results indicate that there is a significant difference in the presence of disruptive behavior disorders in children with ADHD according to *Val<sup>158</sup>Met* genotype. This antisocial behavior in children with ADHD seems to be predicted by *Val/Val* genotype in *COMT* gene. Moreover, pharmacogenetic results suggest an effect of the *COMT* genotype on the trajectory of ODD symptoms improvement with MPH treatment in boys with ADHD.

## Um depoimento

*“Ele era uma criança levada, que não parava no lugar e não se concentrava em nada. Diziam que ele era hiperativo, mas espera aí? Como podia ser hiperativa uma criança que ao jogar videogame ou assistir um jogo do Flamengo na televisão ficava horas e horas parada sem ao menos piscar os olhos?*

*“Mal educado!”, “Sem limites!”, “Capeta!”, “Disperso!”, “Louco!...”. Essas eram algumas frases que ele comumente ouvia.*

*(...)*

*Mandaram-lhe tomar Ritalina, um remédio ruim, que às vezes tira fome, e que lhe daria mais atenção e blá blá blá !!! Algo que ele já estava cansado de ouvir. Ele tomou a medicação sem crença nenhuma naquilo. E o tempo foi passando, ele vivendo sua vida, em uma nova escola, procurando seu lugar no time de futebol do colégio...*

*(...)*

*Hoje ele está na faculdade. Ele ainda tem muito que viver, com seu jeito hiperativo, desatento, mas agora controlado, sem deixar de ser ele mesmo. Ele vai vivendo, com o intuito de um dia poder mostrar que não era um bandido, um mal educado, nem um “sem limites”; era apenas uma pessoa diferente e, como todas outras pessoas diferentes, pode e deu certo na vida.*

*Hoje ele é feliz, tem uma namorada, estuda o que gosta, tem muitos amigos, sua família se orgulha dele e, acima de tudo, ele próprio sabe o que tem e vive feliz com a sua realidade. Ele deseja que o que ele sofreu, outras pessoas não sofram um dia.*

*Ele? Sou eu...*

*Beto”.*

Dedico esse trabalho a todos os pacientes e suas famílias que sofrem devido aos sintomas do TDAH e suas comorbidades. Dedico, principalmente, às crianças que participaram da nossa amostra, tornando possível essa pesquisa.

## AGRADECIMENTOS

---

Essa é a parte mais difícil de ser escrita, pois expor em palavras nossos sentimentos e agradecimentos a pessoas tão especiais é muito difícil. Talvez isso seja óbvio, mas vale repetir que nessa vida nada se faz sozinho e todas as pessoas que estão ao nosso redor nos influenciam e nos dão força para continuarmos os projetos de vida. Todas as pessoas que citarei aqui foram extremamente importantes para a realização desse sonho e não serão citados em ordem crescente ou decrescente de importância.

Começo, portanto, agradecendo meus queridos colegas de departamento e/ou sala. Por nossos papos, cafés e almoços na salinha 117, risadas e muitas coisas úteis e inúteis (mas muito boas) para meu mestrado: Andressa, Angel, Angelina, prof<sup>a</sup> Eliane (Bandi), Gabriela, Gláucia, Guilherme, Gustavo, Juliana, Luciana Lima, Mariana Botton, Mariana Rieck, Verônica, Vanessa, Vinícius e Vivian. E, em especial, à Deise, Estela, Evelise e Luciana Tovo, pela sincera amizade e por algumas vezes serem as amigas que ouviram minhas reclamações e teorias. E ainda às ex-colegas e amigas: Ana Paula, Fabi e Júlia. Obrigada pelo aprendizado e momentos de descontração que me proporcionaram. Fabi, obrigada por ser minha “mãe”, por me aceitar e confiar como tua aluna no dia em que fui te procurar para a vaga de iniciação científica. Tu és um grande exemplo para mim.

Agradeço a professora Marion, que me aceitou como sua “ajudante” na disciplina de Genética I, devido ao meu estágio didático. Adorei!

Agradeço ao Elmo, por estar sempre disponível aos alunos e pela imensa dedicação ao PPGBM.

Um agradecimento em especial à professora Sídia, por estar sempre disponível para responder as minhas dúvidas estatísticas e por estar ao meu lado quando precisei aprender análises de dados repetidos. Sídia, eu adoro as tuas aulas e tua companhia. Tu és um grande exemplo profissional e pessoal para mim, dada a tua competência, inteligência, cordialidade e carinho.

Agradeço imensamente à professora Mara. Obrigada pelo carinho, pela atenção, pela confiança, pelos conselhos, pelo tempo gasto comigo, pelas idéias,



pelo companheirismo e até pelos “puxões de orelha”. Tenho muito orgulho de ter sido tua aluna durante a graduação e mestrado. Espero que isso se prolongue, pelo menos, por mais quatro anos (no doutorado).

Agradeço ao professor Rohde pela dedicação e colaboração inestimável a este trabalho. Obrigada pela confiança e por ser um grande exemplo de dinamismo e dedicação à pesquisa. Agradeço também a toda a equipe do Programa de Déficit de Atenção e Hiperatividade (ProDAH), pela oportunidade de aprendizado, pela coleta da amostra e orientação, especialmente à Clarissa Paim, secretária do Programa, pela competência e atenção.

Agradeço aos meus amigos de longa data, que não entendem direito o que eu estudei no meu mestrado, mas que, mesmo assim, ouviram quando eu explicava o que eu estava fazendo e minhas teorias: Bel, Cabelo, Ju Galak, Márcia, Rodrigo, Rodrigo Machado (conhecido como Mauricinho) e Vanessa. Agradeço aos meus “irmãos biológicos”, Paola e Fábio, por estarem sempre ao meu lado, desde o início da graduação.

Agradeço infinitamente à minha amada família. Agradeço ao meu irmão Guga, à minha cunhada Fernanda e meus sobrinhos Nando, Eduarda, Giovanni e Rafael pela hospedagem em São Paulo quando eu fui para os congressos, pelo companheirismo, pelos conselhos, carinho e amor. Aos meus também sobrinhos, Beatriz e Guilherme, simplesmente por existirem. Vocês são muito importantes. À minha mãe pelo carinho e amor sempre demonstrados. Por, muitas vezes, ter suportado meu mau-humor e cansaço de estar escrevendo meus artigos e estudando. Ao meu pai, pela força que sempre me deu quando precisei, fazendo-me sempre olhar para frente e não desistir diante os obstáculos da vida. À Flávia, minha “stepmother” ou minha “segunda mãe”, por estar sempre disponível quando preciso de ouvidos e de uma psicóloga. À minha “sogrinha” Isabel, pelo apoio em todas as horas e por fazer de mim também sua filha.

E, como não poderia deixar de fazer, agradeço imensamente ao Zé. Meu namorado e amigo. Por me suportar quando irritada, por me fazer sorrir no meio de muitos problemas e coisas para resolver, por me dar força e transmitir o seu amor nos simples gestos do dia-a-dia. Enfim, por me acompanhar sempre e por me fazer tão feliz. Amo-te!

## SUMÁRIO

---

|   |    |
|---|----|
| <b>RESUMO</b> .....   | 3  |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | 5  |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES</b> .....   | 11 |
| <b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO</b> .....  | 12 |
| <i>I.1. Considerações gerais</i> .....  | 13 |
| <i>I.2. TDAH e suas comorbidades</i> .....  | 14 |
| <i>I.3. Neurobiologia do TDAH</i> .....   | 16 |
| <i>I.4. Etiologia do TDAH</i> .....   | 19 |
| I.4.1. Estudos genéticos moleculares do TDAH .....  | 21 |
| I.5. Gene Catecol-O-Metiltransferase (COMT).....  | 24 |
| <i>I.5.1. COMT e TDAH</i> .....   | 25 |
| <i>I.6. Tratamento do TDAH</i> .....  | 28 |
| <i>I.7. Farmacogenética</i> .....   | 30 |
| <b>CAPÍTULO II - JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....  | 31 |
| <b>CAPÍTULO III - ARTIGO 1</b> .....  | 33 |
| Catechol-O-methyltransferase <i>Val<sup>158</sup>Met</i> polymorphism moderates MPH effects<br>on oppositional symptoms in boys with ADHD                                       |    |
| <b>CAPÍTULO IV - ARTIGO 2</b> .....   | 54 |
| Association between the <i>COMT</i> gene and the presence of disruptive behavior<br>disorder in a sample of Brazilian children with Attention Deficit/Hyperactivity<br>Disorder |    |
| <b>CAPÍTULO V - DISCUSSÃO</b> .....   | 66 |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....   | 71 |

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

---

3' UTR - Região 3' não traduzida;

7R – Alelo de sete repetições em *tandem*;

CNVs – do inglês, *Copy Number Variations* (variações no número de cópias);

COMT - Catecol-O-metiltransferase;

CPF - Córtex pré-frontal;

DA – Neurotransmissor dopamina;

DAT - Transportador de dopamina;

DAT1 – Gene do transportador de dopamina;

DRD2 – Receptor de dopamina tipo D2;

DRD3 – Receptor de dopamina tipo D3;

DRD4 – Receptor de dopamina tipo D4;

DRD5 – Receptor de dopamina tipo D5;

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

HRR – do inglês, *Haplotype Relative Risk* (risco relativo de haplótipo);

Kb - Kilo bases (mil pares de bases);

Mb - Mega bases (um milhão de pares de bases);

MB-COMT – Enzima COMT na forma ligada à membrana plasmática;

MPH – do inglês, *Methylphenidate* (Metilfenidato);

mRNA – RNA mensageiro;

NE – Neurotransmissor noradrenalina;

PPI – do inglês, *Prepulse inhibition* (Inibição pré-pulso);

RASS – do inglês, *Restricted Academic Situation Scale* (avaliação acadêmica);

S-COMT - Enzima COMT na forma solúvel;

TC - Transtorno de conduta;

TDAH - Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade;

TDC - Transtornos disruptivos do comportamento;

TDT - Teste de desequilíbrio de transmissão;

TH – Transtornos hipercinéticos;

TOD - Transtorno opositor desafiante;

VNTR - Número variável de repetições em *tandem*.

CAPÍTULO I  
INTRODUÇÃO

---

### ***1.1. Considerações gerais***

O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) é uma das doenças psiquiátricas mais comuns na infância e adolescência. As suas características clínicas principais são sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade. Por afetarem o desempenho acadêmico, as relações familiares e o ajustamento social dos indivíduos, esses sintomas são apontados como de grande impacto na sociedade. O diagnóstico do TDAH é fundamentalmente clínico, baseado em sistemas classificatórios como o Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais, versão IV (DSM-IV). A aplicação desses critérios diagnósticos internacionalmente aceitos possibilitou que o TDAH fosse classificado como um dos diagnósticos clínicos mais bem validados mundialmente (Faraone *et al.*, 2005; Stergiakouli & Thapar 2010). A primeira descrição clínica referente aos transtornos hipercinéticos (THs) foi feita por Still em 1902. A partir dessa descrição, os THs começaram a sofrer inúmeras modificações de nomenclatura, porém o quadro clínico praticamente não se alterou (Barbosa, 1995). Na década de 40, surgiu a designação “lesão cerebral mínima”, que, já em 1962, foi modificada para “disfunção cerebral mínima”, reconhecendo-se que as alterações características da síndrome relacionam-se mais a disfunções em vias nervosas do que propriamente a lesões nas mesmas (Rohde *et al.*, 2000).

Para calcular a prevalência mundial de TDAH em crianças e entender os aspectos que possam influenciar as diferenças nas taxas, que variavam na faixa de 3 a 6%, uma meta-análise, incluindo 102 estudos de todos os continentes, determinou uma prevalência de 5,29% (Polanczyk *et al.* 2007). A partir dos dados obtidos, os autores concluíram que esta prevalência variável parece ser mais bem explicada pelas diferenças metodológicas do que pela localização geográfica dos diferentes estudos incluídos.

De acordo com os critérios do DSM-IV, o TDAH é um transtorno bastante heterogêneo e é caracterizado por apresentar dois grupos básicos de sintomas: desatenção e hiperatividade/impulsividade. 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 tipos clínicos de TDAH podem ser reconhecidos: predominantemente desatento; predominantemente hiperativo/impulsivo e tipo combinado.

As crianças classificadas como predominantemente desatentas ou do subtipo combinado parecem apresentar uma taxa mais elevada de prejuízo acadêmico. Contudo, as crianças do tipo predominantemente hiperativo/impulsivo são mais agressivas e impulsivas do que as crianças com os outros tipos de sintomas. Os subtipos de TDAH apresentam diferenças clínicas e são bem reconhecidos em seu diagnóstico, entretanto, ainda não foi esclarecido se esses subtipos são geneticamente distintos (Stergiakouli & Thapar, 2010).

É importante salientar que os sintomas do TDAH isolados podem resultar de muitos problemas nas relações pessoais das crianças (com os pais e/ou colegas e amigos), de sistemas educacionais inadequados, ou podem estar associados a outros transtornos comumente encontrados na infância e na adolescência. Portanto, para o diagnóstico do TDAH, é sempre necessário contextualizar os sintomas na história de vida da criança, como a duração dos sintomas, sua frequência, intensidade e persistência (Rohde *et al.*, 2000).

O curso clínico desta patologia é bastante heterogêneo e, embora possa ocorrer remissão espontânea com a idade, os sintomas podem persistir até a idade adulta (Wilens & Dodson, 2004). Estima-se que 60% a 70% das crianças que apresentam TDAH permanecerão com esse diagnóstico na vida adulta (Biederman *et al.*, 2000; Wender *et al.* 2001; Manuzza *et al.*, 2003). Dentro desse cenário, os sintomas de hiperatividade e impulsividade tendem a diminuir mais precocemente, enquanto os de desatenção, desorganização e distração são mais persistentes (Wilens & Dodson, 2004; Stergiakouli & Thapar, 2010).

## ***1.2. TDAH e suas comorbidades***

O TDAH apresenta uma alta taxa de comorbidade com os transtornos disruptivos do comportamento (transtorno de conduta e transtorno opositor desafiante). O transtorno opositor desafiante (TOD) é a comorbidade psiquiátrica mais comum em crianças com TDAH, ocorrendo em aproximadamente 60% dos

pacientes. Enquanto o transtorno de conduta (TC) ocorre em aproximadamente 20% das crianças e adolescentes com TDAH (Biederman, 2005; Connor *et al.*, 2010). Em uma amostra de adolescentes brasileiros com TDAH, foi observada uma taxa de 47.8% de casos com transtornos disruptivos do comportamento (TDC) (Rohde *et al.*, 1999).

Através de análises bivariadas, foi sugerido que a contribuição genética para o TC é muito fundamentada nos mesmos fatores genéticos associados ao TDAH (Thapar *et al.*, 2001). Dessa forma, o acúmulo desses fatores de risco seria associado tanto à manifestação de TC quanto ao TDAH, aumentando a probabilidade de ocorrerem simultaneamente (Banaschewski *et al.*, 2003). Por outro lado, a manifestação de sintomas de TDAH, juntamente com TOD/TC, seria uma subsequente complicação dos casos de TDAH (Banaschewski *et al.*, 2003, Thapar *et al.*, 2006). Crianças e adolescentes com TDAH e transtornos disruptivos do comportamento podem representar um grupo patológico distinto, diferindo dos pacientes com TDAH sem TOD ou TC (Banaschewski *et al.*, 2003, Connor *et al.*, 2010). Os diagnósticos de TC e TOD em crianças com TDAH aumentariam o risco para diversos comportamentos antissociais, além de psicopatias na idade adulta (Connor *et al.*, 2010).

Em uma avaliação da influência do gênero em características clínicas do TDAH, Biederman *et al.* (2002) relataram que meninas com TDAH têm um risco diminuído de apresentar TC ou TOD quando comparadas aos meninos. Entretanto, esse resultado provavelmente se deve à taxa base naturalmente mais baixa de transtornos disruptivos do comportamento em meninas, independentemente da presença do TDAH.

Além dos transtornos disruptivos do comportamento, outras comorbidades psiquiátricas podem ser encontradas em crianças com TDAH, como, por exemplo, transtornos de humor bipolar (aproximadamente 25%), transtorno de ansiedade (de 25% a 30%) e transtornos de aprendizagem (aproximadamente 25%) (Biederman, 2005). Rohde *et al.* (1999), encontraram uma taxa de aproximadamente 25% para transtornos de ansiedade, 15% a 20% para depressão e 10% a 25% para transtornos de aprendizagem em uma amostra de crianças e adolescentes brasileiros com TDAH.

Ao longo da vida, o impacto nas atividades pessoais do cotidiano e na sociedade devido ao TDAH não tratado desde a infância é bastante considerável. Na infância, este transtorno está associado com um risco aumentado de baixo desempenho escolar, repetências, relações conturbadas com familiares e colegas. Na adolescência, de 35% a 45% dos indivíduos com TDAH são propensos a apresentar transtornos de conduta e/ou a tornarem-se delinquentes e 15% a 20% possivelmente farão uso de drogas. Muitos indivíduos apresentam um maior risco de expulsões e suspensões escolares e aproximadamente 36% não conseguem finalizar o ensino médio. Adultos diagnosticados com TDAH desde a infância sofrem com prejuízos em atividades profissionais, com maior taxa de desemprego, maiores problemas na condução de automóveis e outros veículos automotivos, dificuldades em relacionamentos pessoais e possuem um risco maior de apresentar um comportamento antissocial associado ao abuso de drogas (Barkley, 2004; Wilens & Dodson, 2004).

### ***1.3. Neurobiologia do TDAH***

Devida à alta heterogeneidade do transtorno, no que diz respeito às manifestações clínicas, acredita-se que a neurobiologia do TDAH seja bastante complexa e que os processos cerebrais envolvidos sejam de difícil compreensão. Por isso, ainda não se tem total conhecimento nessa área e estudar a neurobiologia do TDAH ainda deve ser o objetivo de muitos estudos.

Estudos de imagem e neuropsicológicos mostraram que crianças com TDAH têm um desempenho prejudicado em funções cognitivas e executivas, como a percepção, regulação da atenção, organização e planejamento, além de falhas na inibição de comportamentos e pensamentos inapropriados, processos claramente relacionados ao lobo frontal e áreas subcorticais (Swanson *et al.*, 1998; Arnsten & Li 2005; Diamond, 2007). Basicamente, o córtex pré-frontal (CPF) é responsável pela regulação da atenção, emoção e comportamento, que são funções relacionadas aos sintomas de TDAH (Arnsten, 2009a). As áreas sensoriais do cérebro projetam sua informação até o CPF, o qual regula a atenção baseada em sua relevância, selecionando o que é importante dentro do que está ocorrendo e sendo captado do “mundo externo”. Portanto, o CPF tem a capacidade de



suprimir o processamento de estímulos externos irrelevantes para a atenção e aprimorar o processamento de estímulos, muitas vezes não salientes, importantes para a manutenção da atenção. Além da regulação da atenção, o CPF regula a emoção e o comportamento. O lado direito do CPF é especialmente importante para a regulação de resposta comportamental. Lesões nessas áreas cerebrais em macacos induziram o comportamento hiperativo e impulsivo e estudos de imagem em humanos sugeriram que a área inferior do hemisfério direito do CPF é menos ativa em pacientes com TDAH (Kennard *et al.*, 1941, Dickstein *et al.*, 2006). As porções ventral e mediana do CPF regulam a emoção através de projeções com a amígdala, hipotálamo, núcleo *accumbens* e tronco cerebral. Lesões nas áreas cerebrais frontais podem causar sintomas como distrabilidade, pouca concentração, esquecimento de tarefas e pouca organização, ou seja, produzem sintomatologia muito semelhante ao TDAH (Arnsten & Li, 2005). Autores sugerem que disfunções nessas rotas também podem estar envolvidas com sintomas de oposição, freqüentemente presentes em crianças com TDAH (Arnsten, 2009a; 2009b).

O desequilíbrio nos sistemas das catecolaminas (dopamina e noradrenalina) foi uma das primeiras teorias que surgiram para explicar o TDAH. A teoria dopaminérgica, proposta em 1991 por Levy, sugere que déficits de dopamina (DA) em regiões cerebrais específicas podem causar sintomas de TDAH. Atualmente, é amplamente aceito que crianças com TDAH apresentam um déficit funcional significativo do CPF associado a um aparente desequilíbrio nos sistemas das catecolaminas (Pliszka, 2005; Biederman, 2005; Arnsten & Li, 2005; Prince, 2008; Arnsten, 2009a). A funcionalidade do CPF é altamente sensível aos níveis dos neurotransmissores DA e noradrenalina (NE). A liberação das catecolaminas na fenda sináptica do CPF ocorre de acordo com o estímulo recebido, entretanto a emissão de uma quantidade muito pequena ou excessiva desses neurotransmissores prejudica o funcionamento do CPF, obedecendo graficamente a uma curva em “U” invertido (Arnsten, 2009a; 2009b). Sugere-se que esse desequilíbrio nos níveis de catecolaminas na fenda sináptica determine o surgimento dos sintomas de TDAH e que se houver novamente um nível

adequado desses neurotransmissores, possa ocorrer melhora na sintomatologia do TDAH (Arnsten & Li, 2005).

É importante salientar que o CPF desempenha um papel muito importante na regulação da raiva e da violência. Déficits funcionais e danos estruturais dessa área cerebral podem resultar em TDC. Anderson *et al.* (1999) relataram dois casos (um menino e uma menina) que sofreram lesões especificamente no CPF nos primeiros 16 meses de vida. Ambos mostraram comportamento antissocial durante a infância e este comportamento progrediu para atos de delinquência durante a adolescência e atos criminosos já na idade adulta. Raine (2002) revisou diversos artigos sobre as bases biológicas do comportamento antissocial e agressivo em crianças e adultos focando, entre outros fatores, no déficit funcional do CPF. O autor propôs que crianças e adolescentes que apresentam comportamento antissocial possuem déficits em funções cognitivas, controladas pelo CPF, sendo que três evidências importantes foram apontadas: (1) crianças com TDAH e TC associado apresentam um déficit funcional do CPF mais severo do que crianças com TDAH sem comorbidade; (2) crianças e adolescentes com TC, mas sem TDAH, apresentam um déficit funcional menor no CPF do que pacientes que têm TDAH associado com TC, porém ainda significativo; (3) estudos sobre as funções executivas apóiam a idéia de que existe déficit funcional do CPF em crianças com comportamento antissocial. Estes dados sugerem que o comportamento antissocial depende, pelo menos em parte, do déficit funcional, que pode ser gerado por fatores de risco também associados ao TDAH. Existem também evidências de que comportamentos agressivos e antissociais em pacientes idosos com demência são particularmente associados com déficits em regiões frontais e anteriores do cérebro (Raine, 2002).

Além do foco no CPF, sabe-se também que os cérebros de crianças com TDAH são significativamente menores, em média, do que cérebros de crianças saudáveis (Castellanos *et al.*, 2002; Durston *et al.*, 2004). Castellanos *et al.* (2002) mostraram que crianças com TDAH apresentam menor volume total (-3,2%) e menor volume cerebelar (-3,5%) do que crianças sem este transtorno. 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 em média um volume cerebral 4% menor, quando comparadas com crianças normais. Uma meta-análise de estudos de imagem estruturais confirma uma redução global do cérebro em pacientes com TDAH e indica que as maiores diferenças encontram-se no *vermis* cerebelar, no corpo caloso, no volume cerebral total e direito; e no caudato direito (Valera *et al.*, 2007). Em um estudo longitudinal para verificar o desenvolvimento cortical de pacientes com TDAH, Shaw *et al.* (2007) propuseram que a natureza da disfunção cerebral no TDAH pode estar relacionada a um atraso na maturação do córtex. Neste estudo foram comparadas 223 imagens cerebrais de crianças com TDAH com 223 imagens de crianças saudáveis, e concluiu-se que o padrão do desenvolvimento cerebral é semelhante entre os dois grupos, porém o desenvolvimento difere no tempo, ou seja, a doença parece estar mais relacionada a um atraso no desenvolvimento do que a um desvio neste processo. O atraso na maturação foi mais proeminente em regiões pré-frontais.

#### **1.4. Etiologia do TDAH**

Diversos estudos direcionados à etiologia do TDAH já foram realizados. Entretanto, os fatores que causam o TDAH ainda não estão bem esclarecidos. O que podemos afirmar, através dos estudos existentes, é que o TDAH é determinado por uma multiplicidade de fatores genéticos e ambientais que interagem de uma forma altamente complexa (Steinhausen, 2009; Stergiakouli & Thapar, 2010).

Dentre as contribuições ambientais, as complicações durante a gravidez e parto parecem estar bastante associadas ao TDAH, como saúde debilitada da mãe, eclampsia, idade materna, longa duração do parto, sofrimento fetal e hemorragias (Mick *et al.*, 2002; Biederman & Faraone, 2005). Além disso, muitos estudos indicam que a prematuridade, estimada pelo baixo peso do neonato, é um fator de risco importante para o TDAH (Mick *et al.*, 2002; Indredavik *et al.*, 2004; Biederman & Faraone, 2005). Outros fatores de risco extensivamente

estudados são a exposição materna à nicotina e a ingestão de álcool durante a gravidez, que, inclusive, são fatores fortemente correlacionados ao baixo peso ao nascer (Langley *et al.*, 2007; Thapar *et al.*, 2009). Fumo durante a gravidez é facilmente apontado como um fator de risco ambiental para o TDAH já que receptores nicotínicos regulam a atividade dopaminérgica e o balanço dopaminérgico é uma causa neurobiológica aceita no desenvolvimento desse transtorno (Biederman & Faraone, 2005; Biederman, 2005). Do mesmo modo, fatores que afetam processos específicos implicados no transtorno, como, por exemplo, danos cerebrais perinatais no lobo frontal, podem se relacionar indiretamente com a doença, já que atingem processos de atenção, motivação e planejamento (Levy *et al.*, 1998).

Adversidades psicossociais também são fatores de risco ambientais importantes para o TDAH. Em 1975, Rutter *et al.* apontaram seis fatores de risco no ambiente familiar como altamente associados aos distúrbios mentais durante a infância: discórdia marital grave, classe social baixa, família muito numerosa, criminalidade dos pais, psicopatologia materna e colocação em lar adotivo. Biederman *et al.* (1995; 2002) identificaram que a lista de adversidades psicossociais apontada por Rutter *et al.* (1975) predispõe ao TDAH, sugerindo que diversos conflitos familiares possam influenciar na manifestação desse transtorno.

Estudos genéticos clássicos sugerem uma forte contribuição genética na etiologia do TDAH. Através de investigações com gêmeos, diversos trabalhos apontam uma herdabilidade superior a 70% para o TDAH (Biederman & Faraone, 2005; Biederman, 2005; Steinhausen, 2009). Faraone *et al.* (2005), através de uma revisão de 20 estudos com gêmeos, estimaram uma herdabilidade de 76% e sugeriram que o TDAH provavelmente seja o distúrbio mental com o maior componente hereditário dentro da psiquiatria. Estudos de adoção também mostraram um componente genético para essa patologia. Investigações realizadas com crianças adotadas mostraram que a prevalência da doença entre pais biológicos é três vezes maior do que entre pais adotivos de crianças com TDAH (Thapar *et al.*, 1999; Sprich *et al.*, 2000). Estudos baseados em famílias também mostraram que este transtorno apresenta uma forte recorrência familiar.

O risco para doença é de duas a oito vezes maior para os pais das crianças afetadas terem outro filho afetado do que na população em geral (Faraone & Biederman, 1998; Epstein *et al.*, 2000).

Diversos estudos para conhecer o padrão de herança dessa doença já foram realizados. Atualmente, a hipótese mais aceita sugere que a transmissão do TDAH ocorre através de vários genes de pequeno efeito, que interagem de forma complexa entre si e com o ambiente, conferindo suscetibilidade ao transtorno (Nigg & Goldsmith, 1998; Thapar *et al.*, 1999; Nigg *et al.*, 2010). Os mesmos fatores de risco que influenciam a origem do TDAH podem apresentar um papel importante no curso desse transtorno ao longo do tempo. Entretanto, existe a possibilidade de que existam fatores de risco adicionais (tanto genéticos quanto ambientais) que não influenciam a origem do TDAH, mas contribuem na modificação de seu curso clínico e em suas conseqüências (Thapar *et al.*, 2007).

Deve-se salientar que a definição de subtipos de TDAH pelo DSM-IV, assim como as diferentes formas de tratamento e as várias doenças que podem coexistir, mostra uma grande heterogeneidade fenotípica (Smalley *et al.*, 2000; Caspi *et al.*, 2008). Isto significa que fatores genéticos e ambientais diferentes podem atuar na manifestação das características que compõem os vários quadros clínicos do TDAH. Embora uma alta herdabilidade tenha sido descrita em muitos estudos, essas estimativas foram obtidas considerando o TDAH como uma categoria diagnóstica única. É possível que esta definição não represente um fenótipo válido geneticamente, e que existam aspectos ou subtipos etiológicos mais ou menos herdáveis dentro do TDAH (Thapar *et al.*, 1999).

#### **1.4.1. Estudos genéticos moleculares do TDAH**

Apesar da complexidade fenotípica anteriormente discutida, o processo de identificação de genes de suscetibilidade está começando a desatar o complexo nó da genética do TDAH.

Os estudos de ligação podem nos fornecer dados de possíveis genes de suscetibilidade que podem se localizar nessas áreas genômicas ligadas às doenças complexas. Em uma meta-análise, incluindo sete estudos independentes de ligação por varredura genômica, foi identificada uma região do cromossomo 16

com evidências mais consistentes de ligação ao TDAH (Zhou *et al.*, 2008). Além disso, nove outras regiões parecem estar ligadas à doença. Entretanto, a dificuldade encontrada na replicação dos dados de estudos de ligação reflete o fato de que não existem genes de suscetibilidade com um forte efeito para o TDAH. Assim, os estudos de ligação formam uma abordagem auxiliar, que aponta prováveis genes candidatos às doenças complexas (Mick & Faraone, 2008, Stergiakouli & Thapar, 2010).

Ao contrário dos estudos de ligação, muitos estudos de genes candidatos usam métodos de associação para determinar se variantes genéticas biologicamente relevantes afetam a suscetibilidade ao TDAH. Estudos de associação de genes candidatos selecionam genes que hipoteticamente são implicados na doença e, então, comparam as frequências dos alelos em indivíduos afetados e não afetados (amostra controle) ou através da transmissão alélica em famílias. A seleção dos genes para esse tipo de estudo é baseada nos resultados de estudos de ligação, de estudos em animais, bioquímicos, farmacológicos ou neurobiológicos. Entretanto, estas pesquisas fundamentam-se na patofisiologia das doenças que, em muitos casos, ainda é incerta (Stergiakouli & Thapar, 2010). Evidências indicaram o envolvimento dos sistemas dopaminérgico, noradrenérgico e serotoninérgico na patofisiologia do TDAH (Biederman & Faraone, 2005; Genro *et al.*, 2010; Stergiakouli & Thapar, 2010). Portanto, genes relacionados a estes neurotransmissores parecem candidatos ideais para a suscetibilidade ao TDAH.

O sistema dopaminérgico tem sido o foco principal dos estudos de associação com o TDAH. De acordo com Genro *et al.* (2010), existem quatro conjuntos distintos de evidências que solidificam a relação entre o TDAH e a hipótese dopaminérgica: evidências oriundas de estudos em modelos animais, de estudos farmacológicos, genéticos e de imagem. Swanson *et al.* (2007) sugerem um modelo simplificado para o nível sináptico de dopamina que inclui três passos distintos: (1) A célula dopaminérgica libera o neurotransmissor, o qual tem um receptor específico; (2) O seu transportador recicla alguns dos neurotransmissores liberados, regulando a distribuição no espaço extracelular; (3) Enzimas atuam na metabolização dos neurotransmissores e o inativam. Dos

genes relacionados com o sistema dopaminérgico, os mais bem estudados são os genes do transportador de dopamina (*DAT1*) e do receptor D4 de dopamina (*DRD4*). O gene *DAT1* é um dos principais candidatos porque a proteína transportadora de dopamina controla a neurotransmissão dopaminérgica e é o principal alvo dos estimulantes utilizados no tratamento do TDAH. Além disso, camundongos *knockout* para o gene *DAT1* apresentam um comportamento semelhante ao do TDAH (Genro *et al.*, 2010). Seu polimorfismo mais estudado é um número variável de repetições em *tandem* (VNTR) na região 3' não traduzida (3' UTR). O gene *DRD4* também é bastante investigado, pois além de codificar um receptor direto de DA e NE, é predominantemente expresso na região frontal do cérebro, região esta envolvida na etiologia do TDAH (Genro *et al.*, 2010). Seu polimorfismo mais estudado é um VNTR no éxon III, sendo que o alelo de 7 repetições (7R) parece reduzir a habilidade do receptor de se ligar à dopamina (Stergiakouli & Thapar, 2010). Além disso, existem evidências de que variantes raras presentes nessas repetições possam estar influenciando o TDAH (Rodrigues *et al.*, 2011). Praticamente todos os demais genes conhecidos do sistema dopaminérgico foram objetos de estudos de associação, incluindo os receptores D2 (*DRD2*), D3 (*DRD3*) e D5 (*DRD5*) de dopamina. Através de uma meta-análise, foi confirmada uma associação significativa do alelo de 10 repetições de um VNTR no gene *DAT1*, do alelo 7R do VNTR do éxon 3 no gene *DRD4* e do alelo de 148pb do gene *DRD5* com o TDAH (Gizer *et al.*, 2009). Já em relação aos genes *DRD2* e *DRD3*, não foi encontrada uma associação significativa com o TDAH (Gizer *et al.*, 2009).

Outros prováveis determinantes genéticos do TDAH estão sendo investigados mais recentemente como, por exemplo, a variação no número de cópias de segmentos de DNA (CNVs). Os trabalhos iniciais utilizando essa abordagem sugerem que variações estruturais herdáveis possam ser bastante importantes no desenvolvimento do TDAH. No entanto, mais estudos são necessários para determinar a importância desses novos marcadores nesse transtorno (Stergiakouli & Thapar, 2010; Elia *et al.*, 2010).

Devido à natureza complexa do TDAH, não deve ser esquecida a contribuição conjunta do gene e do ambiente. Os dados de estudos genéticos

devem, sempre que possível, analisar os efeitos ambientais existentes, pois estes podem interferir no efeito genético. A interação gene-ambiente pode oferecer certa dificuldade para a análise, sendo que, em muitos casos, os fatores genéticos só exercem seus efeitos quando o indivíduo é exposto a determinados riscos ambientais (Caspi & Moffitt 2006; Stergiakouli & Thapar, 2010).

### **1.5. Gene Catecol-O-Metiltransferase (COMT)**

A enzima COMT, que participa do metabolismo de catecolaminas, foi descoberta por Julius Axelrod na década de 50, e proporcionou ao autor o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1970 (Axelrod & Tomchick, 1958).

O gene *COMT* está localizado no cromossomo 22q11 e apresenta dois promotores, P1 e P2. Os dois promotores formam seus respectivos mRNAs que, por conseguinte, levam à formação de duas formas protéicas distintas: solúvel (S-COMT) e ligada à membrana plasmática (MB-COMT) (Tenhunen *et al.*, 1993; 1994). A MB-COMT apresenta 50 aminoácidos a mais que a S-COMT e é expressa principalmente no tecido cerebral, enquanto a S-COMT é encontrada mais abundantemente em outros tecidos (Tenhunen *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2004). A função da enzima MB-COMT no cérebro é a degradação das catecolaminas lançadas na fenda sináptica, regulando, portanto, a neurotransmissão dopaminérgica e noradrenérgica. Apesar de a enzima ser expressa em todo o tecido cerebral, o efeito funcional da MB-COMT parece ser específico, atuando em aproximadamente 60% do catabolismo de DA no CPF (Matsumoto *et al.*, 2003; Diaz-Asper *et al.*, 2006). O polimorfismo funcional *Val<sup>158</sup>Met* (rs4680) do gene *COMT* é caracterizado pela transição de guanina para adenina no éxon 4, 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* (Lotta *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2004).

Alguns estudos indicam um dimorfismo sexual do gene *COMT*. Possivelmente o efeito deste gene no sistema dopaminérgico seja diferente entre os sexos feminino e masculino. Foi demonstrado que camundongos machos



mutantes, homozigotos para a mutação de deleção do gene *COMT*, apresentam um nível de dopamina de 2 a 3 vezes maior no CPF quando comparados com os camundongos portadores do genótipo selvagem ou heterozigoto. Entretanto, nas fêmeas, a *COMT* parece não influenciar o nível de dopamina da mesma maneira, não havendo uma mudança significativa. A ausência de efeito significativo quando o gene *COMT* é deletado nas fêmeas provavelmente reflete a existência de mecanismos compensatórios sexo-específicos, como uma maior atividade dos transportadores de DA e NE, por exemplo (Gogos *et al.*, 1998). Além disso, os dados sugerem que esta modificação dos níveis de DA só é significativa no CPF em machos, não influenciando no *striatum* e no hipotálamo dos mesmos. Chen *et al.* (2004) avaliaram a atividade desta enzima no tecido do CPF de 108 cadáveres humanos e descobriram que as mulheres apresentam uma atividade enzimática da *COMT* significativamente menor (17%) do que homens, independente do genótipo (*Val/Val*, *Val/Met* ou *Met/Met*). É interessante ressaltar que foi observada uma diferença na atividade enzimática, apesar dos níveis de mRNA da *COMT* em ambos os sexos serem semelhantes.

Uma evidência da importância do gene *COMT* em doenças psiquiátricas foi sugerida em relação à síndrome da deleção do cromossomo 22q11DS. Microdeleções dessa região cromossômica, na qual o gene *COMT* está localizado, podem determinar a síndrome velocardiocfacial. Várias doenças psiquiátricas foram relatadas em crianças com essa síndrome, como: ansiedade, transtornos de humor, transtorno compulsivo obsessivo e TDAH (Craddock *et al.*, 2006; Mier *et al.*, 2009).

### **1.5.1. *COMT* e TDAH**

O gene *COMT* pode ser considerado um exemplo raro de gene que apresenta um polimorfismo funcional comum na população humana e que possibilita diversas explorações que podem avaliar os desfechos possíveis devido às diferenças funcionais nas enzimas, principalmente no que se refere às funções do CPF (Lanchman, 2008). Diversos estudos sugerem que o polimorfismo *Val<sup>158</sup>Met* influencia a função do CPF, sendo o genótipo *Val/Val* associado a um desempenho prejudicado, podendo interferir diretamente na presença de doenças

psiquiátricas (Craddock *et al.*, 2006; Tunbridge *et al.*, 2006; Mier *et al.*, 2009). Portanto, os indivíduos homocigotos para o alelo *Val* necessitariam de maior ativação pré-frontal, quando comparados a portadores do alelo *Met*, para alcançar um nível mínimo de catecolaminas na fenda sináptica (Tunbridge *et al.*, 2006). A avaliação das diferenças entre a frequência e severidade dos sintomas de TDAH em crianças com o transtorno enquanto desenvolviam tarefas acadêmicas (teste RASS) demonstrou que os indivíduos com genótipo homocigoto *Val* apresentam um desempenho inferior neste teste quando comparados aos portadores do alelo *Met* (Sengupta *et al.*, 2008). Além disso, este trabalho avaliou o efeito do gene *COMT* e o tratamento com metilfenidato (MPH) na resposta ao mesmo método RASS, concluindo que tanto o gene quanto o tratamento com MPH obtiveram um efeito significativo no desempenho do teste (Sengupta *et al.*, 2008).

A inibição pré-pulso (PPI) é um processo onde estímulos externos irrelevantes são discriminados durante os estágios iniciais do processamento da atenção, habilidade essa que está comprometida nos portadores de algumas desordens psiquiátricas devido ao déficit funcional do CPF (Geyer *et al.*, 1990; Giakoumaki *et al.* 2008). Os resultados do estudo feito por Giakoumaki *et al.* (2008) indicam que a inibição da *COMT* por tolcapone aumenta significativamente a PPI em indivíduos homocigotos para o alelo *Val*, os quais normalmente apresentam níveis menores de DA e mais baixo PPI comparativamente aos indivíduos homocigotos para o alelo *Met*. Por outro lado, a administração de tolcapone em indivíduos com genótipo *Met/Met* teve um efeito contrário. Estes resultados confirmam a importância dos níveis basais de PPI e de DA para o efeito dos fármacos que interferem no sistema dopaminérgico e fortalecem a ideia de que existe uma interação entre os níveis de DA no CPF de acordo com a curva em “U” invertida de liberação dopaminérgica.

Em relação à associação direta entre o polimorfismo *Val<sup>158</sup>Met* e TDAH, uma meta-análise realizada por Cheuk & Wong (2006) incluindo doze estudos de associação, revelou que não há evidência suficiente para associar o gene *COMT* ao TDAH. Dentre os doze estudos de associação examinados nesta meta-análise, dez utilizaram o método baseado em famílias (Barr *et al.*, 1999; Eisenberg *et al.*, 1999; Hawi *et al.*, 2000; Manor *et al.*, 2000; Tahir *et al.*, 2000; Payton *et al.*, 2001;

Taerk *et al.*, 2004; Bellgrove *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2005; Turic *et al.* 2005), um utilizou o método caso/controle (Zhang *et al.* 2003) e o 12º estudo utilizou ambos os métodos (Qian *et al.*, 2003). Dos onze estudos que utilizaram o método baseado em famílias, dois utilizaram a análise de risco relativo baseado em haplótipos (HRR) (Eisenberg *et al.*, 1999; Manor *et al.*, 2000), cinco usaram teste de desequilíbrio de transmissão (TDT) (Barr *et al.*, 1999; Payton *et al.*, 2001; Taerk *et al.*, 2004; Bellgrove *et al.*, 2005; Turic *et al.* 2005) e quatro utilizaram ambos os métodos (Hawi *et al.*, 2000; Tahir *et al.*, 2000; Qian *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2005). Dois grupos observaram associação significativa: Eisenberg *et al.* (1999) encontraram relação entre o gene *COMT* e TDAH, sendo o alelo *Val* associado ao transtorno; Qian *et al.* (2003) sugeriram dimorfismo sexual em uma amostra de pacientes chineses, sendo o alelo *metionina* preferencialmente transmitido somente para meninos com TDAH. Duas outras meta-análises mais recentes replicaram os resultados de Cheuk & Wong (2006) e não encontraram associação entre o gene *COMT* e o TDAH (Gizer *et al.*, 2009; Beijsterveldt *et al.*, 2010).

Harrison & Tunbridge (2007) sugeriram que os resultados discrepantes no TDAH possam ser devido ao dimorfismo sexual na função da *COMT*. Os resultados obtidos por Qian *et al.* (2003) indicaram um efeito diferencial do gene *COMT* entre os sexos através de duas análises: (1) por HRR, o alelo *Met* foi preferencialmente transmitido para meninos com TDAH, mas não para meninas; (2) por estudo de caso-controle, o alelo *Val* apresentou uma frequência significativamente maior na amostra de meninas com TDAH. Corroborando esses resultados, Biederman *et al.* (2008) encontraram transmissão preferencial do alelo *Met* em uma amostra de meninos com TDAH, mas não entre as meninas. Quando os dados de ambos os estudos foram analisados conjuntamente, a significância estatística foi mantida (Biederman *et al.* 2008).

Apesar dos estudos apontarem que não existe associação entre o gene *COMT* e o TDAH, a enzima *COMT* parece desempenhar um papel importante na heterogeneidade da doença, influenciando na manifestação de sintomas antissociais, muitas vezes associados ao TDAH. Caspi *et al.* (2008) concluíram que crianças homozigotas para o alelo *Val* apresentam maior número de sintomas

de transtorno de conduta e agressividade, quando comparadas com portadoras do alelo *Met*, sugerindo uma possível contribuição deste gene no comportamento antissocial associado ao TDAH. Outros estudos agregam a importância do gene *COMT* nos sintomas de agressão e escores de psicopatia em sujeitos com TDAH e TC, sendo o genótipo *Val/Val* associado tanto ao maior nível desses sintomas quanto aos escores mais altos de “disfunção emocional” (Monuteaux *et al.*, 2009; Fowler *et al.*, 2009). Em uma amostra de adolescentes infratores do sexo masculino, o alelo *Val* foi associado ao diagnóstico e sintomas de TC (DeYoung *et al.*, 2009). Qian *et al.* (2009) avaliaram 171 crianças com TDAH e verificaram que o genótipo *Val/Val* apresentou uma frequência significativamente maior em pacientes que apresentavam TDAH combinado com TOD, quando comparados com pacientes somente portadores de TDAH. Evidências sugerem que o gene *COMT* parece atuar como um gene modificador, agindo em conjunto com outros fatores genéticos e ambientais na variação fenotípica dos sintomas antissociais, dependentes do funcionamento adequado do CPF, e no curso clínico do TDAH (Tunbridge *et al.*, 2006; Caspi *et al.*, 2008).

Thapar *et al.* (2005) encontraram um efeito do genótipo *Val/Val*, do baixo peso ao nascer e da interação entre esses dois fatores nos sintomas de conduta em crianças com TDAH. Além disso, status socioeconômico baixo dos pais e o genótipo *Val/Val* interagem aumentando a probabilidade das crianças apresentarem TDAH (Nobile *et al.*, 2009). Portanto, embora ainda poucos estudos tenham demonstrado alguma interação significativa entre o gene *COMT* e fatores ambientais no TDAH, diversos trabalhos sugerem que o genótipo *Val/Val* possa predispor o indivíduo a uma maior suscetibilidade aos efeitos ambientais.

## **1.6. Tratamento do TDAH**

O tratamento do TDAH envolve uma abordagem múltipla, englobando intervenções psicossociais e psicofarmacológicas (Rohde *et al.*, 2000).

Na intervenção psicossocial, é muito importante que os pais e familiares, além dos professores, entendam o problema através de informações claras e precisas a respeito do transtorno. A psicoterapia também pode ser indicada em diversos casos, servindo como orientação e apoio ao indivíduo (Rohde *et al.*,

2000). Apesar de algumas evidências científicas apontarem a eficácia da abordagem psicossocial no tratamento do TDAH, resultados do MTA (1999) demonstraram uma eficácia superior da medicação nos sintomas centrais do transtorno. Este ensaio clínico multicêntrico acompanhou 579 crianças com TDAH por 14 meses e aquelas que tiveram uma abordagem combinada (medicação e intervenção psicossocial) não resultou em maior eficácia quando comparada à abordagem apenas medicamentosa.

Em relação às intervenções farmacológicas, os estimulantes são claramente apresentados como as medicações de primeira escolha para o transtorno. Há mais de 50 anos, o MPH é um dos fármacos comumente prescritos para o tratamento do TDAH (Swanson *et al.*, 1998; Wilens, 2008). A dose terapêutica normalmente se situa na faixa de 20 a 60 mg/dia. Cerca de 70% dos pacientes com TDAH respondem adequadamente aos estimulantes, com redução de pelo menos 50% dos sintomas básicos do transtorno com uma grande melhora na qualidade de vida (Goldman *et al.*, 1998; Rohde *et al.*, 2000; Castellanos & Tannock, 2002; Wilens, 2008). Além disso, Serra-Pinheiro *et al.* (2004) concluíram que MPH é igualmente eficaz no tratamento para crianças com transtorno opositor desafiante, assim como o TDAH.

Apesar da eficácia reconhecida, os efeitos específicos destes compostos no cérebro ainda não foram bem esclarecidos. Vários estudos sugerem que esse medicamento bloqueie o DAT e o transportador de noradrenalina, aumentando os níveis de catecolaminas na fenda sináptica (Solanto, 1998; Vles *et al.*, 2003; Devilbiss & Berridge, 2008; Wilens, 2008; Arnsten, 2009a). Foi proposta a hipótese de que o bloqueio do DAT por MPH aumentaria a ativação de auto-receptores de DA na membrana pré-sináptica, atenuando a liberação do neurotransmissor quando a célula for ativada. Entretanto, o DAT bloqueado consegue ter um efeito inibitório na ativação desses auto-receptores dopaminérgicos, convergindo os efeitos para o acúmulo de DA na fenda sináptica e sua amplificação de sinal (Volkow *et al.*, 2005; Wilens, 2008). Os resultados que evidenciam a eficácia dos estimulantes no tratamento do TDAH diretamente ligada às funções do CPF reafirmam que o entendimento sobre o desequilíbrio do

sistema de catecolaminas é fundamental para o estudo do TDAH (Berridge *et al.*, 2006; Devilbiss & Berridge, 2008; Prince, 2008).

### ***1.7. Farmacogenética***

A resposta ao tratamento é influenciada por diversos fatores individuais, determinando o efeito do tratamento medicamentoso. Diferenças fisiológicas e ambientais, que afetam os indivíduos na população em geral, podem resultar na heterogeneidade observada na resposta aos fármacos (Goldstein *et al.*, 2007). Em alguns casos, entretanto, a heterogeneidade da resposta não pode ser somente explicada por estes fatores e por isso fatores genéticos devem ser considerados como uma possível fonte de variabilidade na resposta. Dessa forma, a farmacogenética é definida como o estudo da variabilidade na resposta à medicação devida à hereditariedade (Froehlich *et al.*, 2010).

Com relação a farmacogenética do TDAH, diversos estudos já foram realizados, sendo a maioria relacionada ao sistema dopaminérgico, em especial o gene *DAT* (Polanczyk *et al.*, 2005; McGough, 2005). Polanczyk *et al.* (2005) sugerem que a regulação da produção de neurotransmissores durante a ação dos estimulantes é uma área promissora para estudo, porém pouco explorada. Esses investigadores citam principalmente a importância de estudar o gene *Catecol-O-Metiltransferase (COMT)*. No único estudo publicado sobre este tema, uma associação entre o polimorfismo *Val<sup>158</sup>Met* com resposta ao MPH em crianças com TDAH foi observada, sugerindo interação entre *COMT* e MPH na regulação do nível de catecolaminas no CPF (Kereszturi *et al.*, 2007).

## CAPÍTULO II

### JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

---

Devido à alta prevalência mundial, ao grande prejuízo na vida de pacientes e seus familiares e ao conseqüente custo financeiro, o TDAH exerce um grande impacto em nossa sociedade. Além disso, está entre os transtornos com maior componente genético da psiquiatria. Por isso, é de grande importância determinar os genes de suscetibilidade envolvidos nesta patologia. Do mesmo modo, devido à heterogeneidade da resposta ao tratamento com estimulantes, estudar os fatores genéticos que possam determinar esta variabilidade é de grande importância para os pacientes e familiares. Assim, no futuro, talvez possamos identificar o melhor tratamento individual.

Pouco se sabe sobre quais são os fatores de suscetibilidade ou moduladores que fazem a ligação entre TDAH e sintomas de TDC. Portanto, ainda se fazem necessários mais estudos que avaliem variantes genéticas específicas para a ocorrência concomitante de TDC e TDAH em crianças e adolescentes.

Apesar dos trabalhos mostrarem que a COMT participa da degradação das catecolaminas na fenda sináptica e que o MPH, bastante utilizado no tratamento do TDAH, age aumentando os níveis desses neurotransmissores, ainda faltam estudos que analisem o efeito da COMT no tratamento deste transtorno. Além disso, é possível que haja uma correlação entre as variantes de *Val<sup>158</sup>Met* com o escore de oposição, devido aos indícios de que a COMT esteja associada a comportamentos antissociais em indivíduos com TDAH.

Portanto, os objetivos deste trabalho são:

- 1 – Determinar se o polimorfismo *Val<sup>158</sup>Met* do gene *COMT* está envolvido na melhora dos sintomas de oposição em crianças com TDAH tratadas com metilfenidato;
- 2 – Verificar se o polimorfismo *Val<sup>158</sup>Met* do gene *COMT* está associado à presença de transtornos disruptivos do comportamento em comorbidade com o TDAH em crianças;



CAPÍTULO III

ARTIGO 1

---

Submetido à *Biological Psychiatry*.

**Catechol-O-methyltransferase Val<sup>158</sup>Met polymorphism moderates MPH effects on oppositional symptoms in boys with ADHD.**

**Angélica Salatino-Oliveira<sup>1</sup>, Julia P. Genro<sup>1</sup>, Cristian Zeni<sup>2</sup>, Guilherme V. Polanczyk<sup>2</sup>, Rodrigo Chazan<sup>2</sup>, Ana P. Guimarães<sup>1</sup>, Sidia M. Callegari-Jacques<sup>3</sup>, Luis A. Rohde<sup>2</sup> and Mara H. Hutz<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Genetics Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup> Division of Child and Adolescent Psychiatry, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. Instituto de Psiquiatria do Desenvolvimento para a Infância e Adolescência.

<sup>3</sup>Statistics Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Correspondence to:

Prof. Mara H. Hutz

Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS.

Caixa Postal 15053

91501-970- Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: 55-51-3308-6720

FAX: 55-51-3308-7311

E-mail: mara.hutz@ufrgs.br

Key words: ADHD, COMT, pharmacogenetics, methylphenidate, Val<sup>158</sup>Met.

Abstract: 248 words

Text: 3021 words

Figures: 2

Tables: 1

## Abstract

**Background:** The Catechol-O-methyltransferase (COMT) enzyme plays a key role in the function of prefrontal cortex accounting for most of the degradation of dopamine. Previous studies have documented the improvement of oppositional symptoms in ADHD patients with methylphenidate (MPH) treatment. However, the effect of the *COMT* gene in the response to MPH on oppositional symptoms has not been investigated.

**Methods:** A total of 251 children with ADHD fulfilled inclusion criteria to participate in the study. 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 outcome measure was the parent-rated oppositional subscale of the Swanson, Nolan and Pelham Scale – version IV. The scale was applied by child psychiatrists blinded to genotype at baseline and in the first and third months. The *COMT Val<sup>158</sup>Met* polymorphism was genotype by PCR-based methods.

**Results:** We detected significant improvement in SNAP-IV oppositional scores from baseline to the first and three months of treatment ( $n = 112$ ;  $F_{2,231} = 5.35$ ,  $p = 0.005$ ). A significant effect of the presence of *Met* allele in ODD scores during treatment ( $F_{1,148} = 5.02$ ,  $p = 0.027$ ), and a significant interaction between the *Met* allele and treatment over time for the SNAP-IV oppositional scores during this period of treatment ( $F_{2,229} = 6.40$ ,  $p = 0.002$ ) were both observed.

**Conclusions:** These results suggest an effect of the *COMT* genotype on the trajectory of ODD symptoms improvement with MPH treatment in boys with ADHD.

## Introduction

Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is a common, complex and highly heritable disorder, characterized by inattentive, impulsive and hyperactive behavior. ADHD is one of the most common childhood behavioral disorders, affecting around 5% of school-aged children worldwide (1). Children with ADHD present increased rates of disruptive behavior disorders (DBDs). About 60% of children with ADHD exhibit oppositional defiant disorder (ODD) and between 10 and 20% exhibit conduct disorder (CD) (2-4). Clinical, epidemiological, and behavioral genetic studies have suggested that the presence of childhood-onset antisocial behavior in ADHD might be an important marker of disorder heterogeneity (5). Although the neurobiology of ADHD and ODD/CD are not completely understood, several studies suggest that those disorders result from abnormalities in the frontal regions of the brain, particularly the prefrontal cortex (PFC). Underpinning these abnormalities are disturbances of dopaminergic and noradrenergic neurotransmissions (6-10).

Methylphenidate (MPH) is the most widely used drug to treat ADHD (7, 11, 12). This stimulant improves not only the cardinal symptoms of ADHD, but also ODD and CD symptoms such as aggressiveness (13 – 15). The effect of MPH on catecholaminergic pathways results in an improvement of the PFC functioning. Some studies proposed that the most important action of MPH is the increase of norepinephrine (NE) and dopamine (DA) efflux within the PFC (6, 16). Whereas dopamine uptake in caudate and nucleus accumbens depends primarily on the dopamine transporter (DAT), dopamine uptake in frontal cortex depends primarily on the norepinephrine transporter (NET). These data underscore the fact that which transporter clears dopamine from a given region depends on both the affinities and the local densities of the transporters (17).

Catechol-O-methyltransferase (COMT) catalyzes the extraneuronal degradation of catecholamines through O-methyl group addition. As there is significantly lower DAT protein concentration in the PFC than in other brain areas, the PFC seems to be more dependent on COMT mechanisms to terminate the action of the DA released (18 - 20). The human *COMT* gene is located on

chromosome 22q11, and the most studied polymorphism in this gene is *Val*<sup>158</sup>*Met* (rs4680). This polymorphism is a functional genetic variant determined by a valine-to-methionine substitution at codon 158 in COMT membrane-bound form, which is primarily expressed in the brain (21 - 23). The *Methionine* (*Met*) allele results in a 3-4-fold reduction in enzyme activity (21, 22).

Different findings suggest that comorbidity between ADHD and ODD/CD is due to a shared genetic liability either operating directly or indirectly through gene-environment interactions (24). The common genetic factors involved in covariation between antisocial behavior and ADHD have not been identified, but it has been suggested that *COMT* may play a role in the manifestation of antisocial behavior in children with ADHD. Several investigations showed that ADHD children with a *Val/Val* homozygous genotype have more symptoms of conduct disorder, have more aggressive scores, and “emotional dysfunction” psychopathy scores, when compared with *Met* allele carriers (5, 25). Moreover, the *COMT* gene *Val/Val* genotype, birth weight and a significant gene x environment (*COMT* x birth weight) interaction presented the greater risk for early-onset antisocial behavior in a high-risk clinical group (26). In a sample of incarcerated Russian adolescent male delinquents, the *Val* allele was significantly associated with CD diagnosis and symptoms (27).

One area less explored in pharmacogenomic ADHD studies is the regulation of neurotransmitter production and turnover at or near the site of drug action (28). Notwithstanding findings indicate an important relationship between *COMT* gene and antisocial behavior or oppositional symptoms in ADHD. There is one pharmacogenetic study with *Val*<sup>158</sup>*Met* polymorphism that investigated only core ADHD symptoms: hyperactivity/impulsivity and inattention. In that investigation, *Val/Val* homozygous children had significantly less severe symptoms than those with a *Met/Met* genotype after treatment with MPH (29).

Considering the possible effects of *COMT* gene on CD/ODD behavior comorbid with ADHD, the objective of this study was to evaluate the association between the *COMT Val*<sup>158</sup>*Met* and clinical improvement of oppositional symptoms with MPH treatment in boys 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 Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Inclusion criteria for this investigation were: ADHD diagnosis according to DSM-IV criteria, age between 4 and 17 years, European-Brazilian ethnicity as determined by skin color and morphological characteristics, drug-naïve for MPH, prescribed MPH doses of at least 0.3 mg/Kg/day. The diagnoses of ADHD and comorbidities were achieved in three steps: semistructured interviews (Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children–Epidemiologic Version), diagnostic discussion in a clinical committee, and clinical evaluation. Experienced child psychiatrists confirmed all generated diagnoses (30, 31). During the study, 251 children fulfilled inclusion criteria to participate. A hundred seventeen subjects were excluded from the sample due to baseline scores lower than 1 on the SNAP-IV oppositional subscales (n=106), irregular use of MPH and discontinued treatment (n=7), and genotyping failures (n=4). Because there are evidences that *COMT* might contribute to male-female differences across many domains of brain function, structure, and development (32 – 34), 22 girls were also excluded. The Ethical committee of HCPA approved the study protocol. Parents provided written informed consent and probands provided verbal assent to participate.

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

The parent-rated oppositional subscale of the Swanson, Nolan and Pelham scale – version IV (SNAP-IV), was selected as the primary outcome measure (35). This questionnaire has been frequently used in ADHD investigations (30, 31, 36).

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 events (37). MPH was administered preferentially twice daily (at 8:00 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. The

mean daily dosages of MPH hydrochloride prescribed at baseline and at the 1-month assessment were 0.5 and 0.65 mg/kg, respectively. Clinical assessments were performed by child psychiatrists at baseline prior to medication and after 1 and 3 months of MPH treatment.

### **Genotyping**

DNA was extracted from whole blood lymphocytes by standard procedures. The *Val<sup>158</sup>Met* polymorphism was genotyped using the polymerase chain reaction (PCR), with protocols previously described (38).

### **Statistical analysis**

The  $\chi^2$  test or Fisher exact test was used for categorical variables, for continuous variables with and without normal distribution, *t* test and Wilcoxon-Mann-Whitney (WMW) test were used, respectively. Potential confounders evaluated were IQ, ADHD subtype, comorbid conditions (mood, anxiety, and disruptive behavior disorder), age, MPH dosage, concomitant prescription of another medication, previous use of medication, concomitant psychosocial treatment, and SNAP-IV 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 (MEM), which produces a flexible framework for the analysis of repeated measures while accounting for missing data (eg, loss to follow-up) (39 – 41). The best covariance structure fitting the data was selected based on the one with the lowest Akaike information criterion (AIC) value among those that convergence has been achieved. Independent factors included in the model were treatment over time and group assignment (defined as the presence of the risk genotype *Val/Val*). The difference in inattentive and hyperactivity/impulsivity scores between baseline and third month of treatment was included into the model as a covariate for conceptual reasons (i.e., in order to rule out the possibility that the effects of *COMT* genotype on the trajectory of

oppositional symptoms associated with MPH use occurred due to a halo effect determined by changes in ADHD core symptoms). In addition, the SNAP-IV oppositional baseline scores were also included into the model. All possible interactions were tested, but non-significant interactions were dropped in a final model using a backward elimination procedure. We restricted analyses of the oppositional SNAP-IV dimension to patients with baseline scores higher than 1 on the SNAP-IV oppositional subscales to allow sufficient room for improvement, as described previously (31).

SPSS version 18.0 was used for all analyses (SPSS Inc, Chicago, Ill). A significance level of 5% was set for all analyses (except for potential confounders, as indicated previously). Tests were 2-tailed.

## Results

The allele frequencies observed were 0.56 and 0.44 for *Val* and *Met* allele, respectively. The genotype distributions were consistent with Hardy-Weinberg equilibrium. About 32% of individuals were *Val/Val* homozygous, 50% were heterozygous, and 18% were *Met/Met* homozygous.

Table 1 shows demographic and clinical characteristics of patients according to the presence of the *Met* allele. Genotype/alleles were coded *a priori* based on functional activity and association with risk of aggressive/antisocial behavior (5, 25, 26). No statistically significant between-group differences on potential confounders were found. Moreover, no potential confounder was associated with both the presence of *Met* allele and oppositional scores in SNAP-IV.

Figure 1 shows the trajectory of ODD symptoms during MPH treatment based on findings from the mixed-effects model including treatment over time and the presence of *Met* allele, as main effects, SNAP-IV oppositional baseline scores and the difference in inattentive and hyperactivity/impulsivity scores as covariates and significant interactions between these factors during the three months of treatment (n = 112). An independent effect of treatment over time ( $F_{2,231} = 5.35$ ,  $p = 0.005$ ), and of the SNAP-IV oppositional baseline scores ( $F_{1,150} = 130.65$ ,  $p <$



0.001) were found. The interaction between these two factors was statistically significant ( $F_{2,231} = 13.69$ ,  $p < 0.001$ ). The effect of the  $\Delta$  in inattentive and hyperactivity/impulsivity scores ( $F_{1,152} = 0.079$ ,  $p = 0.779$ ) was not found. However, interactions between this factor and treatment over time ( $F_{2,230} = 17.11$ ,  $p < 0.001$ ) and the SNAP-IV oppositional baseline scores ( $F_{1,152} = 7.12$ ,  $p = 0.008$ ) were statistically significant. Moreover, a significant effect of the presence of *Met* allele ( $F_{1,148} = 5.02$ ,  $p = 0.027$ ), and a significant interaction effect between the *Met* allele and treatment over time ( $F_{2,229} = 6.40$ ,  $p = 0.002$ ) were also observed. No 3<sup>rd</sup> order interactions were significant. The working correlation matrix with the lowest AIC value was the first-order autoregressive.

Likewise, the effects of the presence of the *Met* allele on these changes in oppositional scores from baseline to the first and third months of treatment were simultaneously analyzed using a MEM ( $n = 112$ ; Figure 2). The differences in inattentive and hyperactivity/impulsivity scores between baseline and third month of treatment and SNAP-IV oppositional baseline scores were also included into the model. The covariance structure with the lowest AIC value was the first-order autoregressive one. This analysis also demonstrated a significant effect of the *COMT* genotype on the changes in scores ( $F_{1,107} = 5.67$ ,  $p = 0.019$ ). The independent effects of the differences in inattentive and hyperactivity/impulsivity scores ( $F_{1,112} = 0.16$ ,  $p = 0.687$ ) and of SNAP-IV oppositional baseline scores ( $F_{1,110} = 2.98$ ,  $p = 0.087$ ) were not found. However, the interaction between these covariates was statistically significant ( $F_{1,111} = 7.05$ ,  $p = 0.009$ ) and it was the only interaction that remained after backward elimination procedure. From baseline to the first and third months of treatment, individuals with the *Met* allele achieved greater reduction of oppositional scores than individuals without this allele.

## Discussion

This investigation suggested that ADHD boys with at least one *Met* allele have a significantly different trajectory of improvement on oppositional symptoms than *Val* homozygotes when they are treated with MPH. We are unaware of any

previous studies investigating the effect of *COMT* gene specifically in oppositional symptoms in response to methylphenidate treatment.

Although the biological mechanisms to explain our results have not yet been fully determined, we can consider some important points. Evidences suggest that ADHD has multiple etiologies - genetic, environmental, neurobiological, and neurochemical - and that catecholamine dysfunction, is an important underlying feature (11, 42). Therefore, it is reasonable to hypothesize that medications that increase DA availability and/or decrease its breakdown should improve ADHD symptoms. In the PFC, where concentrations of DAT are relatively low compared with NET, it has been postulated that DA is transported by the NET (11, 17, 43). Moreover, some studies indicate that, at low doses that enhance cognitive function, psychostimulants as MPH elicit a moderate and preferential activation of PFC catecholamine neurotransmission (16). Several investigations suggest that MPH inhibits DAT as well as NET and it regulates dopaminergic and noradrenergic transmission (42, 44 – 46). Psychostimulants increase NE and DA efflux widely throughout the brain at higher doses, but even when MPH is administered at relatively low to median -doses as in the present study, it preferentially activates DA and NE efflux within the PFC (16). We cannot draw firm conclusions about the relationship between *COMT* enzyme and MPH action in improvement of oppositional symptoms in ADHD. However, *COMT* may play a regulator role in catecholamine balance created by MPH action in PFC. *COMT* with a *Valine* at the 158 position has a 3-4-fold increase in enzyme activity, and it would act as an antagonist, because it degrades DA and NE more quickly. Since the greatest effect of treatment occurred from baseline to the first month of treatment as expected, the observed effect might reflect a faster response of *Met* allele carriers instead of an enduring response. Follow up studies are clearly needed to address this issue for fully disclose the role of *COMT* in MPH action.

Although the neurobiological route by which *COMT* affect antisocial behavior remains speculative, *COMT* is related to impaired executive functions and antisocial children and delinquents specifically have a deficit with respect to executive functions (47). These data would support the notion of PFC deficits also in this kind of behavior. However, *COMT* does not appear to be a susceptibility

gene for oppositional or aggressive behavior in the general population. Rather, the *Val*<sup>158</sup>*Met* variant seems to influence phenotypic variation within children with ADHD (5). In the present study we did not observe differences between *COMT* genotypes at the baseline rate of SNAP-IV oppositional scores or in the rate of ODD/CD comorbid disorders. There are many possible explanations for this amongst which are the potential absence of some environmental factors in our sample that might be relevant for gene–environment interactions associated with ODD/CD in subjects with ADHD, genetic and clinical heterogeneity determining non-replication in association studies (48, 25). Finally, our design – frequently used in pharmacological studies – requiring a minimum threshold of ODD symptoms as an inclusion criterion might have obscured potential between-group differences.

The pharmacogenetic investigation of the effect of MPH on parent-rated SNAP-IV symptoms in part of this sample was previously tested in three different studies. Two dopaminergic genes (*DRD4*, *DAT1*) and three serotonergic genes (*5-HTT*, *HTR1B*, *HTR2A*) were investigated in SNAP-IV subscales with negative results (30, 31). Polanczyk *et al* (31) tested only the parent-rated inattentive subscale of SNAP-IV as the primary outcome measure in the association reported with the *ADRA2A* gene. The effect of monoamine oxidase A (*MAOA*) gene was investigated only with oppositional SNAP-IV scores with positive results (36). In the present study only the parent-rated opposition subscale of SNAP-IV was tested in boys with ADHD due to previous associations of *COMT* gene with CD and antisocial behavior in children with ADHD, considering the sex difference in *COMT* activity (5, 25, 27, 33).

However, the overall results presented in this study should be viewed in the context of some limitations. The sample is of moderate size. This was a naturalistic study. This design might be valuable to better appreciate the role of genetic factors in routine clinical practice beyond the realm of controlled clinical trials, but some caveats of this kind of studies should be considered. First, we had no internal control to correct for any effect of time (*eg*, regression to the mean) or expectancy bias, because we did not have a placebo arm in this trial. Randomized clinical trials previously reported obtained improvement of ADHD symptoms similar

to the one detected in our sample (49). Although a placebo response was likely present in our study and decreased the power by reducing the measurement precision of drug response, it is unlikely that the placebo response was systematically associated with the polymorphism analyzed. Additionally, we minimized the chance that the higher reduction in SNAP-IV oppositional scores with MPH treatment detected in carriers of the *Met* allele might be attributed to other events since we performed an extensive assessment of potential confounders between groups with and without this allele. Second, MPH 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 but there is no reason to expect a preferential compliance to MPH according to *Val<sup>158</sup>Met* genotypes at *COMT*. Nevertheless, according to the parents, there was an important overall symptomatic reduction during follow-up. Third, it has been suggested that oppositional defiant disorder (ODD) temporally precedes both conduct disorder and depression, and therefore has a central role in the development of a wide range of child psychopathology (50, 51). Recently it has been shown that ODD has an important role in the development of both affective and behavioral psychopathology (50). In the present study only the SNAP-IV subscale of oppositional symptoms was used and we did not attempt to classify these symptoms in different constructs, but Fowler *et al* (2009) reported that *COMT Val/Val* genotype were associated with both childhood CD symptoms and 'emotional dysfunction' psychopathy scores. Further studies should be conducted using other instruments and larger samples to assess if the *Val<sup>158</sup>Met* genotype at *COMT* has a differential influence on both dimensions.

Pharmacogenetic studies that evaluate candidate genes are very important, but single gene effects are small (52). Thus, candidate gene studies should implement strategies that will provide enough statistical power to detect such small effects. The examination of specific dimensions of medication response is one potential strategy because it reduces heterogeneity. We detected the role of *COMT Val<sup>158</sup>Met* polymorphism in the trajectory of oppositional scores reduction associated with MPH treatment in boys with ADHD but since this is the first study

to show the pharmacogenetic effect of *COMT* on oppositional symptoms, replication of these results are warranted.

### **Acknowledgements**

The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Institutos do Milênio (CNPq), PRONEX, and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul e de São Paulo (FAPERGS e FAPESP) for financial support.

### **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. 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.

### **References**

1. Polanczyk G, Lima MS, Horta BL, Biederman J, Rohde LA (2007): The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry* 164: 942-948.
2. Biederman J, Faraone SV (2005): Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet* 366: 237-248.
3. Thapar A, van den Bree M, Fowler T, Langley K, Whittinger N (2006): Predictors of antisocial behaviour in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 15: 118-125.
4. Souza I, Pinheiro MA, Denardin D, Mattos P, Rohde LA (2004): Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and comorbidity in Brazil: Comparisons between two referred samples. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 13: 243-248.
5. Caspi A, Langley K, Milne B, Moffitt TE, O'Donovan M, Owen MJ, *et al.* (2008): A replicated molecular genetic basis for subtyping antisocial behavior in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry* 65: 203-210.

6. Arnsten AFT, Li BM (2005): Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biol Psychiatry* 57: 1377-1384.
7. Solanto MV (2002): Dopamine dysfunction in AD/HD: integrating clinical and basic neuroscience research. *Behav Brain Res* 130: 65-71.
8. Pliszka SR (2005): The neuropsychopharmacology of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57: 1385-1390.
9. Nelson RJ, Trainor BC (2007): Neural mechanisms of aggression. *Nat Rev Neurosci* 8: 536-546.
10. Prince J (2008): Catecholamine dysfunction in attention-deficit/hyperactivity disorder: an update. *J Clin Psychopharmacol* 28: S39-S45.
11. Wilens TE (2008): Effects of methylphenidate on the catecholaminergic system in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychopharmacol* 28: S46-53.
12. Szobot CM, Ketzer C, Parente MA, Biederman J, Rohde LA (2004): The acute effect of methylphenidate in Brazilian male children and adolescents with ADHD: A randomized clinical trial. *J Atten Disord* 8: 37-43.
13. Goldman LS, Genel M, Bezman RJ, Slanetz PJ (1998): Diagnosis and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents. Council on Scientific Affairs, American Medical Association. *Jama* 279:1100-1107.
14. Serra-Pinheiro MA, Mattos P, Souza I, Pastura G, Gomes F (2004): The effect of methylphenidate on oppositional defiant disorder comorbid with attention deficit/hyperactivity disorder. *Arq Neuropsiquiatr* 62: 399-402.
15. Jensen PS, Arnold LE, Swanson JM, Vitiello B, Abikoff HB, Greenhill LL, Hechtman L, *et al.* (2007): 3-Year Follow-up of the NIMH MTA Study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 46: 989-1002.
16. Berridge CW, Devilbiss DM, Andrzejewski ME, Arnsten AF, Kelley AE, Schmeichel B, *et al.* (2006): Methylphenidate preferentially increases catecholamine neurotransmission within the prefrontal cortex at low doses that enhance cognitive function. *Biol Psychiatry* 60: 1111-1120.
17. Morón JA, Brockington A, Wise RA, Rocha BA, Hope BT (2002): Dopamine uptake through the Norepinephrine transporter in brain regions with low levels of the dopamine transporter: evidence from knock-out mouse lines. *J Neurosci* 22: 389-395.
18. Mier D, Kirsch P, Meyer-Lindenberg A (2009): Neural substrates of pleiotropic action of genetic variation in COMT: a meta-analysis. *Mol Psychiatry* :1-10.
19. Nobile M, Rusconi M, Bellina M, Marino C, Giorda R, Carlet O, *et al.* (2009): COMT Val<sup>158</sup>Met polymorphism and socioeconomic status interact to predict attention deficit/hyperactivity problems in children aged 10-14. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 19: 549-557.
20. Diamond A (2007): Consequences of variations in genes that affect dopamine in prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 17: i161-i170.

21. Tenhunen J, Salminen M, Lundstrom K, Kiviluoto T, Savolainen R, Ulmanen I (1994): Genomic organization of the human catechol O-methyltransferase gene and its expression from two distinct promoters. *Eur J Biochem* 223: 1049-1059.
22. Lotta T, Vidgren J, Tilgmann C, Ulmanen I, Melen K, Julkunen I, Taskinen J (1995): Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochemistry* 34: 4202-4210.
23. Chen J, Lipska BK, Halim N, Ma QD, Matsumoto M, Melhem S (2004): Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. *Am J Hum Genet* 75: 807-821.
24. Nadder TS, Rutter M, Silberg JL, Maes HH, Eaves LJ (2002): Genetic effects on the variation and covariation of attention deficit-hyperactivity disorder (ADHD) and oppositional-defiant disorder/conduct disorder (Odd/CD) symptomatologies across informant and occasion of measurement. *Psychol Med* 32: 39-53.
25. Fowler T, Langley K, Rice F, van den Bree MBM, Ross K, Wilkinson LS, *et al.* (2009): Psychopathy traits in adolescents with childhood ADHD: the contribution of genotypes affecting MAOA, 5HTT and COMT activity. *Br J Psychiatry* 19: 312-319.
26. Thapar A, Langley K, Fowler T, Rice F, Turic D, Whittinger N, *et al* (2005): Catechol O-methyltransferase gene variant and birth weight predict early-onset antisocial behavior in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry* 62: 1275-1278.
27. DeYoung CG, Getchell M, Kuposov RA, Yrigollen CM, Haeffel GJ, af Klinteberg B, *et al.* (2009): Variation in the catechol-O-methyltransferase Val<sup>158</sup>Met polymorphism associated with conduct disorder and ADHD symptoms, among adolescent male delinquents. *Psychiatr Genet* 20: 20-24.
28. Polanczyk G, Zeni C, Genro JP, Roman T, Hutz MH, Rohde LA (2005): Attention-deficit/hyperactivity disorder: advancing on pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 6: 225-234.
29. Kereszturi E, Tarnok Z, Bogнар E, Lakatos K, Farkas L, Gadoros J, *et al.* (2008): Catechol-O-methyltransferase Val<sup>158</sup>Met polymorphism is associated with methylphenidate response in ADHD children. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B: 1431-1435.
30. Zeni CP, Guimarões 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: 391-394.
31. Polanczyk G, Guimaraes AP, Polanczyk GV, Genro JP, Roman T, Hutz MH, Rohde LA (2007): Association of the adrenergic alpha2A receptor gene with methylphenidate improvement of inattentive symptoms in children and

- adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry* 64: 218-24.
32. Gogos JA, Morgan M, Luine V, Santha M, Ogawa S, Pfaff D, Karayiorgou M (1998): Catechol-O-methyltransferase-deficient mice exhibit sexually dimorphic changes in catecholamine levels and behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9991-9996.
  33. Harrison PJ, Tunbridge EM (2008) Catechol-O-methyltransferase (COMT): a gene contributing to sex differences in brain function, and to sexual dimorphism in the predisposition to psychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology* 33: 3037-3045.
  34. 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 Neuropsychiatr Genet* 147B: 1511-1518.
  35. Swanson JM, Kraemer HC, Hinshaw SP, Arnold LE, Conners CK, Abikoff HB, *et al.* (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.
  36. Guimarães AP, Zeni C, Polanczyk G, Genro JP, Roman T, Hutz MH, Rohde LA (2009): MAOA is associated with methylphenidate improvement of oppositional symptoms in boys with attention deficit hyperactivity disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 12: 709-714.
  37. Rohde LA (2002): ADHD in Brazil: the DSM-IV criteria in a culturally different population. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 41: 1131-1133.
  38. Kunugi H, Nanko S, Ueki A, Otsuka E, Hattori M, Hoda F, *et al.* (1997): High and low activity alleles of catechol-O-methyltransferase gene: ethnic difference and possible association with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 221: 202-204.
  39. Gibbons RD, Hedeker D, Elkin I, Waternaux C, Kraemer HC, Greenhouse JB *et al.* (1993) 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* 50:739-750.
  40. Mallinckrodt CH, Clark WS, David SR (2001) Accounting for dropout bias using mixed-effects models. *J Biopharm Stat* 11: 9-21.
  41. Gueorguieva R, Krystal JH (2004) More over ANOVA: progress in analyzing repeated-measures data and its reflection in papers published in the Archives of General Psychiatry. *Arch Gen Psychiatry* 61: 310-317.
  42. Vles JS, Feron FJ, Hendriksen JG, Jolles J, van Kroonenburgh MJ, Weber WE (2003): Methylphenidate down-regulates the dopamine receptor and transporter system in children with attention deficit hyperkinetic disorder (ADHD). *Neuropediatrics* 34: 77-80.



43. Coulter CL, Happe HK, Murrin LC (1996): Postnatal development of the dopamine transporter: a quantitative autoradiographic study. *Dev Brain Res* 92: 172-181.
44. Arnsten AFT (2006): Stimulants: Therapeutic actions in ADHD. *Neuropsychopharmacology* 31: 2376-2383.
45. Engert V, Pruessner JC (2008): Dopaminergic and Noradrenergic Contributions to Functionality in ADHD: The Role of Methylphenidate. *Curr Neuropharmacol* 6: 322-328.
46. Han DD, Gu HH (2006): Comparison of the monoamine transporters from human and mouse in their sensitivities to psychostimulant drugs. *BMC Pharmacology* 3:1-7.
47. Raine A (2002): Annotation: the role of prefrontal deficits, low autonomic arousal, and early health factors in the development of antisocial and aggressive behavior in children. *J Child Psychol Psychiatry* 43: 417-434.
48. Caspi A, McClay J, Moffitt TE, Mill J, Martin J, Craig IW, *et al.* (2002): Role of Genotype in the Cycle of Violence in Maltreated Children. *Science* 297: 752
49. MTA Cooperative Group (1999): A 14-month randomized clinical trial of treatment strategies for attention-deficit/hyperactivity disorder. The MTA Cooperative Group. Multimodal Treatment Study of Children with ADHD. *Arch Gen Psychiatry* 56: 1073-1086.
50. Burke JD, Hipwell AE, Loeber R (2010): Dimensions of Oppositional Defiant Disorder as Predictors of Depression and Conduct Disorder in Preadolescent Girls. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 49: 484-492.
51. Loeber R, Burke JD, Pardini DA (2009): Development and Etiology of Disruptive and Delinquent Behavior. *Annu Rev Clin Psychol* 5:291–310.
52. Kieling C, Genro JP, Hutz MH, Rohde LA (2010): A current update on ADHD pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 11: 407-419.

## Figure legends

**Figure 1:** Mean Swanson, Nolan and Pelham scale – version IV (SNAP-IV) oppositional scores during methylphenidate treatment according to *COMT* genotype in a mixed-effects model (n = 112). There were effects of treatment over time (n = 112;  $F_{2,231} = 5.35$ ,  $p = 0.005$ ), for presence of *Met* allele ( $F_{1,148} = 5.02$ ,  $p = 0.027$ ), and a significant interaction between these factors ( $F_{2,229} = 6.40$ ,  $p = 0.002$ ) on improvement of SNAP-IV oppositional scores in boys during the treatment with methylphenidate for 3 months.

**Figure 2:** Effect of the presence of the *Met* allele on mean reductions in Swanson, Nolan, and Pelham Scale version IV (SNAP-IV) oppositional scores from baseline in a mixed-effects model (n = 112). Presence of the *Met* allele:  $F_{1,107} = 5.67$ ,  $p = 0.019$ .

Table 1. Demographic and clinical characteristics of the patients investigated according to *Val*<sup>158</sup>*Met* polymorphism.

| Demographic and clinical characteristics                | <i>Val</i><br>homozygous<br>(n = 35) |         | <i>Met</i><br>carriers<br>(n = 77) |         | <i>P</i><br>value |
|---|--------------------------------------|---------|------------------------------------|---------|-------------------|
| Age   | 9.03                                 | ± 2.93  | 9.88                               | ± 2.90  | 0.15              |
| IQ  | 95.29                                | ± 16.38 | 94.09                              | ± 13.28 | 0.69              |
| ADHD subtype  |                                      |         |                                    |         | 0.35              |
| Inattentive   | 2                                    | 5.7%    | 11                                 | 14.5%   |                   |
| Hyperactive   | 6                                    | 17.1%   | 6                                  | 7.9%    |                   |
| Combined  | 25                                   | 71.4%   | 55                                 | 71.0%   |                   |
| Subthreshold  | 2                                    | 5.7%    | 5                                  | 6.6%    |                   |
| Comorbid conditions                                     |                                      |         |                                    |         |                   |
| CD  | 9                                    | 25.7%   | 18                                 | 23.4%   | 0.81              |
| ODD   | 20                                   | 57.1%   | 38                                 | 49.4%   | 0.12              |
| Mood disorder   | 5                                    | 14.3%   | 12                                 | 15.6%   | >0.99             |
| Anxiety disorder  | 10                                   | 28.6%   | 22                                 | 28.6%   | >0.99             |
| SNAP-IV baseline scores                                 |                                      |         |                                    |         |                   |
| Total   | 1.93                                 | ± 0.46  | 1.87                               | ± 0.45  | 0.55              |
| Inattentive   | 2.02                                 | ± 0.60  | 1.98                               | ± 0.56  | 0.70              |
| Hyperactivity/Impulsivity                               | 1.98                                 | ± 0.61  | 1.90                               | ± 0.62  | 0.54              |
| Oppositional  | 1.75                                 | ± 0.55  | 1.71                               | ± 0.57  | 0.69              |
| Methylphenidate dose prescribed at baseline (mg/kg/dia) | 0.54                                 | ± 0.19  | 0.49                               | ± 0.14  | 0.18              |
| Concomitant psychosocial treatment                      | 11                                   | 31.4%   | 34                                 | 44.2%   | 0.22              |
| Concomitant prescription of another medication          | 3                                    | 8.6%    | 6                                  | 7.8%    | >0.99             |
| Previous use of medication                              | 2                                    | 5.7%    | 10                                 | 13.2%   | 0.33              |

Abbreviations: ADHD, Attention deficit hyperactivity disorder; CD, conduct disorder; ODD, oppositional defiant disorder; SNAP-IV, Swanson, Nolan and Pelham Scale – version IV; *Val*, valine; *Met*, methionine.

<sup>a</sup>Data are given as number (percentage) or mean (± standard deviations).

<sup>b</sup>Calculated by *t* test (quantitative variables with normal distribution), Mann-Whitney *U* test (quantitative variables without normal distribution), and  $\chi^2$  test or Fisher exact test (categorical variables).

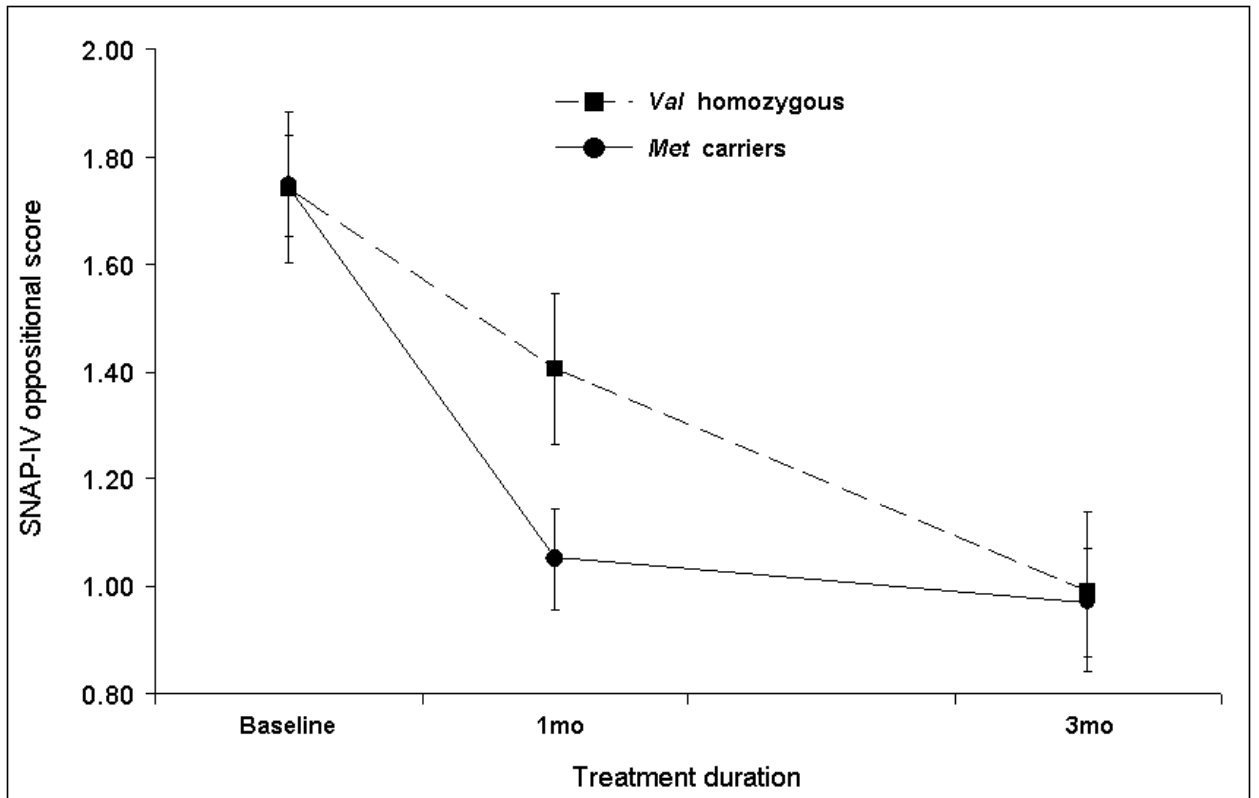


Figure 1

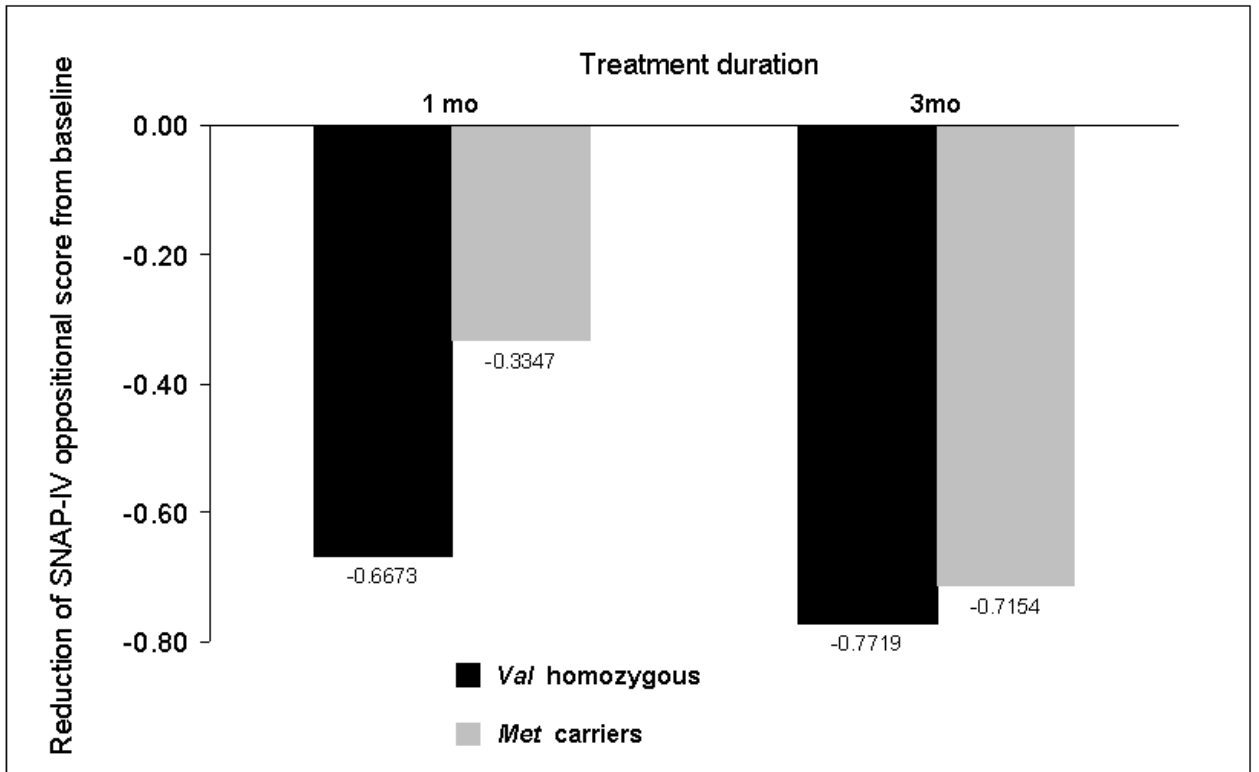


Figure 2

CAPÍTULO IV

ARTIGO 2

---

Manuscrito em preparação.

**Association between the *COMT* gene and the presence of disruptive behavior disorder in a sample of Brazilian children with Attention Deficit/Hyperactivity Disorder.**

**Angélica Salatino-Oliveira<sup>1</sup>, Julia Genro<sup>1</sup>, Ana P. Guimarães<sup>1</sup>, Cristian Zeni<sup>2</sup>,  
Guilherme Polanczyk<sup>2</sup>, Tatiana Roman<sup>1</sup>, Luis A. Rohde<sup>2</sup>, Mara H. Hutz<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Genetics Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup> Division of Child and Adolescent Psychiatry, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. Instituto de Psiquiatria do Desenvolvimento para a Infância e Adolescência.

Correspondence to:  
Prof. Mara H. Hutz  
Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS.  
Caixa Postal 15053  
91501-970- Porto Alegre, RS, Brazil  
Phone: 55-51-3308-6720  
FAX: 55-51-3308-7311  
E-mail: mara.hutz@ufrgs.br

Running head title: The *Val<sup>158</sup>Met* genotype in children with ADHD and DBD.

## **Abstract**

COMT influences the regulation of catecholamine levels in prefrontal cortex (PFC), because it participates in the degradation of these neurotransmitters. Most of the degradation of dopamine in PFC is performed by COMT. Neurobiological studies suggest that abnormalities in the PFC functionality interfere with the developing of symptoms of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and antisocial behavior often associated with this disease. The objective of this study was to test whether the *COMT* gene is associated with the presence of disruptive behavior disorders in children with ADHD. A total sample of 473 children with ADHD was genotyped for the *Val<sup>158</sup>Met* polymorphism. A consensus diagnosis of ADHD with or without comorbidity was achieved through a three-stage process, as previously described in the literature. The results indicate that there is a significant difference in the presence of disruptive behavior disorders in children with ADHD according to genotype. Antisocial behavior in children with ADHD seems to be predicted by *Val/Val* genotype in *COMT* gene.

Key words: DBD, ODD, CD, polymorphism, *Val<sup>158</sup>Met*.



## Introduction

Attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is a very heterogeneous disorder broadly characterized by symptoms of inattention, impulsivity and hyperactivity. This neurodevelopmental disorder is one of the most prevalent mental health disorders in childhood and adolescence, affecting 5.3% of children worldwide (Polanczyk *et al.*, 2007). Comorbidity is very common in TDAH. Around two thirds of children with ADHD have a diagnosis of another psychiatric disorder (Stergiakouli and Thapar, 2010). Oppositional defiant disorder (ODD) is the most common psychiatric comorbidity in children with ADHD; it occurs in about 60% of patients. Moreover, conduct disorder (CD) occurs between 10 and 20% of children with ADHD (Connor *et al.*, 2010). The literature highlights that ADHD and CD or ODD share a common genetic etiology, and when they are manifested together seems to be a more severe ADHD subtype (Connor *et al.*, 2010; Hamilton and Armando, 2008). The presence of comorbid ODD or CD symptoms in patients with ADHD can negatively affect the course and prognosis of ADHD itself (Thapar *et al.*, 2006; Connor *et al.*, 2010). These disorders are clustered as disruptive behavior disorder (DBD; DSM-IV, 1994).

The prefrontal cortex (PFC) is responsible for regulating attention, emotion and behavior, which are functions related to ADHD symptoms. Inadequate catecholamine transmission (dopaminergic and noradrenergic) can lead to PFC deficits and symptoms similar to ADHD, while optimal catecholamine transmission can strengthen PFC regulation of attention and behavior and ameliorate ADHD symptomology (Arnsten, 2009). Moreover, children with conduct disorder comorbid with ADHD show the most severe executive functional deficits while children with conduct disorder without ADHD have less severe, executive function deficits (Raine, 2002).

The human *Catechol-O-methyltransferase* (COMT) gene, located on chromosome 22q11, encodes an enzyme that catalyzes one of the major degradation pathways of catecholamine neurotransmitters (Tenhunen *et al.*, 1993, Tenhunen *et al.*, 1994). About 60% of dopamine degradation in the prefrontal cortex is performed by COMT (Diaz-Asper *et al.*, 2006). The polymorphism Val<sup>158</sup>Met (rs4680) is a functional genetic variant which consists of a guanine to

adenine mutation, resulting in a substitution of Valine (*Val*) for Methionine (*Met*) during enzyme synthesis. The *Met* amino acid results in a protein with a fourfold reduction in enzymatic activity. Therefore, *Met* carriers show higher dopamine brain levels, especially in the PFC (Lotta *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2004). The *Val*<sup>158</sup>*Met* polymorphism directly affects the functioning of the PFC. This functional polymorphism has been associated with several characteristics related to antisocial behavior comorbid with ADHD. Children with ADHD that are *Val/Val* carriers present more symptoms of CD and “emotional dysfunction” psychopathy scores, they are more aggressive and they are often more motivated to crime when compared to children with the *Met* allele (Caspi *et al.*, 2008; Monuteaux *et al.*, 2009; DeYoung *et al.*, 2009; Fowler *et al.*, 2009). Furthermore, Qian *et al.* (2009) suggested that ADHD with ODD comorbidity was associated with *Val* allele homozygosity in boys between 6 and 17.5 years old. Therefore, the aim of this study is to test whether the *COMT* gene is associated with DBD in Brazilian children with ADHD.

## **Material and Methods**

### **Subjects**

A total of 473 children with ADHD were included in the study. The largest sample was composed of 373 children with ADHD clinical diagnosis recruited at the Child and Adolescent Psychiatric Division of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). A consensus diagnosis of ADHD and comorbidity was achieved through a three-stage process, described in detail previously (Roman *et al.*, 2001). The remaining 100 subjects were children with ADHD-inattentive type. This group was ascertained from 12 public schools. Inclusion and diagnostic criteria for this sample have been fully described elsewhere (Schmitz *et al.*, 2006). Clinical and demographic features of the 473 children according to their genotypes are shown in table 1. The Ethics Committee of the HCPA approved the study protocol. The parents have provided written informed consent and children have provided a verbal consent for participation in this study.

## Genotyping

DNA was extracted from whole blood lymphocytes by a salting out procedure as described by Lahiri and Nurnberger (1991). The *Val*<sup>158</sup>*Met* polymorphism was genotyped using TaqMan SNP Genotyping Assay by demand (Real Time PCR, Applied Biosystems) according to the manufacturer's recommended protocol.

## Statistical Analyses

Allele frequencies were estimated by counting. Comparison among categorical variables was performed using chi-square or Fisher's exact test. All quantitative variables did not show a normal distribution. Therefore, non-parametric tests were used (Mann-Whitney *U* test). The significance level accepted was .05. Potential confounders evaluated were age, sex, ethnic background, ADHD subtype and IQ. A confounder was defined as a variable associated with both independent (*COMT* genotype) and dependent (DBD comorbidity) variables ( $p \leq 0.2$ ). No confounders were found using the criteria given. Comparison tests, OR and respective 0.95 confidence interval (0.95 CI) were obtained using the SPSS 12 version software.

## Results

The allele frequencies observed were 0.55 and 0.45 for *Val* and *Met* allele, respectively. The genotypes was grouped *a priori* based on functional activity and association with risk of aggressive/antisocial behavior and conduct problems in previous studies (Thapar *et al.*, 2005, Caspi *et al.*, 2008, Fowler *et al.*, 2009; Monuteaux *et al.*, 2009; DeYoung *et al.*, 2009). The genotype distributions were consistent with Hardy-Weinberg equilibrium. About 30% of the individuals were *Val/Val* homozygous, 51% were heterozygous, and 19% were *Met/Met* homozygous.

Based on the *Val*<sup>158</sup>*Met* genotypes, subjects were sub-divided in two groups: 143 homozygous for the *Val* allele and 330 *Met* allele carriers. The patients with

*Val/Val* genotype presented 12% higher frequency of DBDs than *Met* carriers (table 2;  $\chi^2 = 5.729$ ,  $p = 0.017$ , OR = 1.62).

## Discussion

In this study, we assessed the association between *Val*<sup>158</sup>*Met* polymorphism of the *COMT* gene and the presence of DBD comorbid with ADHD in children. Patients homozygous for *Val* allele showed a higher frequency of DBD than *Met* allele carriers. These results suggest that children with ADHD and *Val/Val* genotype have a higher risk to develop disruptive behavior disorders than patients with *Met* allele.

Our study supports previous findings about the importance of *COMT* in the etiology of disruptive behavior so commonly associated with ADHD (Thapar *et al.*, 2005; Caspi *et al.*, 2008; DeYoung *et al.*, 2009; Fowler *et al.*, 2009; Qian *et al.*, 2009). It is unclear exactly what role the *COMT* enzyme has in the etiology of ADHD, and how it interferes with antisocial behavior. However, a possibility involving impaired executive functions can not be ruled out. Executive functions are processed primarily by the PFC which is responsible to inhibit inappropriate behavior and thought, monitor actions, plan and organize the future, and regulate attention (Arnsten, 2009). Furthermore, the catecholamines noradrenaline (NE) and dopamine (DA) are decisive to PFC function (Arnsten, 2009).

Caspi *et al.* (2008) reported that *COMT* did not appear to be a susceptibility gene for aggression or antisocial behavior in the general population. The association between the *COMT Val*<sup>158</sup>*Met* polymorphism and antisocial behavior was observed only in individuals with ADHD. Therefore, it was suggested that this variant influenced phenotypic variation within children with ADHD and predicted which of these children would engage in antisocial behavior. On the other hand, DeYoung *et al.* (2009) showed that increased risk for antisocial behavior associated with the *Val* allele is not confined to populations with ADHD. Furthermore, the risky background represented by incarceration for criminal behavior was apparently sufficient to produce a significant effect of *Val*<sup>158</sup>*Met* variation on antisocial behavior. Our results indicate that the *COMT* gene may

influence the emergence of antisocial behavior in children with ADHD. It is probable that *COMT* acts as a modifier gene, which requires other factors to alter the clinical phenotype and the development of ADHD. Further studies are necessary to better address this question.

This work should be interpreted in the context of some limitations. First, the sample size was moderate; a larger sample would be more appropriated. Second, ADHD or related disorders might be accounted for by both genetic and environmental factors such as maternal prenatal smoking or drinking, family conflict, poor quality of parent-child relationships, and the possible interaction with other genes and environmental factors that were not analyzed in the present study. It is also important to consider that ADHD is a very heterogeneous disorder, and besides CD and ODD, other psychiatric comorbidities could be present with ADHD, and perhaps influence this result (Rohde *et al.*, 2000, Biederman, 2005).

In conclusion, recent studies have brought evidences to demonstrate the importance of *COMT* on DBD associated with ADHD. These findings reinforce the genetic heterogeneity of ADHD, which can contribute consistently to subdivision on clinical and biological different groups. There are still many questions to be answered regarding the action of *COMT* in the regulation of DBD's symptoms in ADHD. However, our findings corroborate previous results that *COMT Val/Val* genotype influences the emergence of DBD in youths with ADHD.

## References

- American Psychiatric Association. 1994. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Ed. (DSM-IV). Washington: American Psychiatric Association.
- Arnsten AFT. 2009. Toward a new understanding of attention-deficit hyperactivity disorder pathophysiology. *CNS Drugs* 23: 33 – 41.
- Biederman J (2005) Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Selective Overview. *Biol Psychiatry* 57, 1215-1220.
- Caspi A, Langley K, Milne B, Moffitt TE, O'Donovan M, Owen MJ, Tomas MP, Poulton R, Rutter M, Taylor A, Williams B, Thapar A. 2008. A Replicated Molecular Genetic Basis for Subtyping Antisocial Behavior in Children With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Arch Gen Psychiatry* 65: 203-210.

- Chen J, Lipska BK, Halim N, Ma QD, Matsumoto M, Melhem S, Kolachana BS, Hyde TM, Herman MM, Apud J, Egan MF, Kleinman JE, Weinberger DR. 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.
- Connor DF, Steeber J, McBurnett K. 2010. A Review of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Complicated by Symptoms of Oppositional Defiant Disorder or Conduct Disorder. *J Dev Behav Pediatr* 31: 427-440.
- Craddock N, Owen MJ, O'Donovan MC. 2006. The catechol-O-methyltransferase (COMT) gene as a candidate for psychiatric phenotypes: evidence and lessons. *Mol Psychiatry* 11: 446-458.
- DeYoung CG, Getchell M, Koposov RA, Yrigollen CM, Haefel GJ, Klinteberg B, Orelund L, Ruchkin VV, Pakstis AJ, Grigorenko EL. 2009. Variation in the catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism associated with conduct disorder and ADHD symptoms, among adolescent male delinquents. *Psychiatr Genet* 20: 20-24
- Diaz-Asper CM, Weinberger DR, Goldberg TE. 2006. Catechol-O-methyltransferase polymorphisms and some implications for cognitive therapeutics. *NeuroRx* 3: 97-105.
- Fowler T, Langley K, Rice F, Van den Bree MBM, Ross K, Wilkinson LS, Owen MJ, O'Donovan MC, Thapar A. 2009. Psychopathy trait scores in adolescents with childhood ADHD: the contribution of genotypes affecting MAOA, 5HTT and COMT activity. *Psychiatr Genet* 19, 312-319.
- Hamilton SS and Armando J. 2008. Oppositional Defiant Disorder. *Am Fam Physician* 78, 861-866.
- Lahiri DK and Nurnberger JI. 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research* 19: 5444.
- Lotta T, Vidgren J, Tilgmann C, Ulmanen I, Melen K, Julkunen I, Taskinen J. 1995. Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase: A revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochemistry* 34: 4202-4210.
- Monuteaux MC, Biederman J, Doyle AE, Mick E, Faraone SV. 2009. Genetic risk for conduct disorder symptom subtypes in an ADHD sample: specificity to aggressive symptoms. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 48: 757 - 764.
- Polanczyk G, De Lima MS, Horta BL, Biederman J, Rohde LA. 2007. The worldwide prevalence of ADHD: A systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry* 164: 942 – 948.
- Qian QJ, Liu J, Wang YF, Yang L, Guan LL, Faraone S. 2009. Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder comorbid oppositional defiant disorder and its predominately inattentive type: evidence for an association with COMT but not MAOA in a chinese sample. *Behav Brain Functions* 5: 8.

- Raine A. 2002. Annotation: The role of prefrontal deficits, low autonomic arousal, and early health factors in the development of antisocial and aggressive behavior in children. *J Child Psychol Psychiatry* 43: 417-434.
- Rohde LA, Barbosa G, Tramontina S, Polanczyk G. 2000. Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade. *Rev Bras Psiquiatr* 22: 7 – 11.
- Roman T, Schmitz M, Polanczyk G, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH (2001) Attention-Deficit Hyperactivity Disorder: A study of association with both the dopamine transporter gene and the dopamine D4 receptor gene. *Neuropsych Genetics* 105: 471 - 478.
- Schmitz M, Denardin D, Silva TL, Pianca T, Hutz MH, Faraone S, Rohde LA. 2006. Smoking During Pregnancy and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder, Predominantly Inattentive Type: A Case-Control Study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 45: 1338 - 1345.
- Stergiakouli E and Thapar A. 2010. Fitting the pieces together: current research on the genetic basis of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Neuropsychiatr Dis Treat* 7: 551-560.
- Tenhunen J, Salminen M, Jalanko A, Ukkonen S, Ulmanen I. 1993. Structure of the rat catechol-O-methyltransferase gene: separate promoters are used to produce mRNAs for soluble and membrane-bound forms of the enzyme. *DNA and cell biology* 12: 253-263.
- Tenhunen J, Salminen M, Lundström K, Kiviluoto T, Savolainen R, Ulmanen I. 1994. Genomic organization of the human catechol-O-methyltransferase gene and its expression from two distinct promoters. *Eur J Biochem* 223: 1049-1059.
- Thapar A, Langley K, Fowler T, Rice F, Turic D, Whittinger N, Aggleton J, Van-den-Bree M, Owen M, O'Donovan M. 2005. Catechol O-Methyltransferase Gene Variant and Birth Weight Predict Early-Onset Antisocial Behavior in Children With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Arch Gen Psychiatry* 62: 1275-1278.
- Thapar A, Van den Bree M, Fowler T, Langley K, Whittinger N. 2006. Predictors of antisocial behaviour in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 15: 118 - 125.
- Tunbridge EM, Harrison PJ, Weinberger DR. 2006. Catechol-*o*-Methyltransferase, Cognition, and Psychosis: Val<sup>158</sup>Met and Beyond. *Biol Psychiatry* 60:141-151.

Table 1: Demographic and clinical characteristics of the sample according to the presence of *Met* allele<sup>a</sup>.

| Characteristic                 | <i>Val</i> homozygous<br>(n = 143) |        | <i>Met</i> carriers<br>(n = 330) |        | <i>P</i> value <sup>b</sup> |
|--------------------------------|------------------------------------|--------|----------------------------------|--------|-----------------------------|
|                                |                                    |        |                                  |        |                             |
| Age (years)                    | 10.50                              | ± 0.28 | 10.55                            | ± 0.17 | 0.68                        |
| IQ                             | 93.36                              | ± 1.19 | 92.71                            | ± 0.73 | 0.94                        |
| Sex (males)                    | 112                                | 87.32% | 252                              | 76.36% | 0.81                        |
| Ethnicity (European-Brazilian) | 106                                | 74.13% | 265                              | 80.30% | 0.30                        |
| ADHD subtype                   |                                    |        |                                  |        | 0.23                        |
| Inattentive                    | 49                                 | 34.27% | 133                              | 40.31% |                             |
| Hyperactive                    | 11                                 | 7.70%  | 14                               | 4.24%  |                             |
| Combined                       | 74                                 | 51.75% | 170                              | 51.51% |                             |
| Subthreshold                   | 9                                  | 6.28%  | 13                               | 3.94%  |                             |

Abbreviations: ADHD, Attention Deficit/Hyperactivity Disorder; *Val*, Valine; *Met*, Methionine.

<sup>a</sup>Data are given as number (percentage) or mean (± standard deviations)

<sup>b</sup>Calculated by Mann-Whitney U test (quantitative variables without normal distribution), and  $\chi^2$  test or Fisher exact test (categorical variables).



Table 2: The presence of disruptive behavior disorders comorbid with ADHD according to *COMT* genotype.

|                    | <b>COMT genotype</b>  |          |                     |          | <b>OR (0.95 CI)</b> | <b>P</b> |
|--------------------|-----------------------|----------|---------------------|----------|---------------------|----------|
|                    | <b>Val homozygous</b> |          | <b>Met carriers</b> |          |                     |          |
|                    | <b>N</b>              | <b>%</b> | <b>N</b>            | <b>%</b> |                     |          |
| <b>With DBD</b>    | 83                    | 58.0%    | 152                 | 46.1%    | 1.62 (1.09 - 2.41)  | 0.017    |
| <b>Without DBD</b> | 60                    | 42.0%    | 178                 | 53.9%    |                     |          |
| <b>Total</b>       | 143                   | 100.0%   | 330                 | 100.0%   |                     |          |

Abbreviations: DBD, Disruptive Behavior Disorder; *Val*, Valine; *Met*, Methionine.

CAPÍTULO V

DISCUSSÃO

---

A discussão aqui apresentada tem como objetivo integrar brevemente os resultados obtidos neste trabalho a partir de uma perspectiva mais ampla e geral do assunto. As discussões específicas dos resultados obtidos foram abordadas nos capítulos III e IV. Assim, pretende-se continuar abordando este tema de forma não repetitiva.

Como já discutido anteriormente, o fato do TDAH ser uma doença complexa e de alta heterogeneidade, ainda não foi possível determinar os genes envolvidos na sua etiologia que expliquem toda a variabilidade fenotípica encontrada nesse transtorno. Através de muitos estudos, diversos autores concluíram que os critérios diagnósticos existentes, apesar de bem validados, não facilitam o mapeamento de genes de suscetibilidade e seu efeito fenotípico (Castellanos & Tannock, 2002). Da mesma forma, o conceito de comportamento antissocial engloba um fenótipo altamente complexo, desde transtorno opositor desafiante e transtorno de conduta até atos de criminalidade (Thapar *et al.*, 2006). O TC e o TOD são muito freqüentes em comorbidade ao TDAH. Nesses casos, crianças e adolescentes desenvolvem problemas mais sérios ao longo da vida, devido aos sintomas antissociais, do que pacientes com TDAH sem qualquer uma dessas comorbidades (Thapar *et al.*, 2001; Hamilton & Armando, 2008). Segundo alguns autores, há um suporte clínico que permite distinguir as crianças com “TDAH+TDC” como uma condição clínica mais severa das demais, dentro da variabilidade fenotípica encontrada no TDAH. Na reunião dessas informações, podemos questionar se existe um novo subtipo do transtorno. Podemos considerar as crianças e adolescentes com TDAH e TDC como um grupo com o diagnóstico distinto dos demais? Esse possível grupo apresenta suscetibilidade genética diferenciada de pacientes com “TDAH puro”?

Dentro de um gradiente de fatores de suscetibilidade ao TDAH, sugere-se que o grupo fenotípico representado por pacientes que manifestam TDAH e TC localiza-se no intervalo extremo, Esses pacientes apresentariam um acúmulo maior de fatores de risco genéticos e ambientais (Thapar *et al.*, 2001). Por conseguinte, esses transtornos parecem ser predominantemente mediados pelo mesmo conjunto de fatores de risco genético (Thapar *et al.*, 2006). Embora os genes de suscetibilidade ao TDAH potencialmente possam interferir no

surgimento de TDC, devem ainda existir variantes genéticas com efeito modulador, que influenciam na manifestação clínica de TDC em crianças com TDAH. O gene *COMT* parece agir como um gene modificador, que influencia a variação fenotípica dentro do grupo de pacientes com TDAH. Possivelmente esse gene seja um preditor dentre as crianças com TDAH, de quais provavelmente apresentarão sintomas antissociais (Caspi *et al.*, 2008). Nossos resultados corroboram essa hipótese, e pacientes homozigotos para o alelo *Val* aparentemente mostram uma maior probabilidade de manifestar TDC em conjunto com o TDAH.

Dentre as lições importantes apontadas pelas pesquisas do gene *COMT* em outras doenças psiquiátricas, destaca-se a necessidade de agrupar os indivíduos analisados em subgrupos clínicos, para permitir comparações mais significativas, inclusive entre diferentes estudos (Craddock *et al.*, 2006). Portanto, devido às complicações mais severas nos casos de jovens com TDC comórbido ao TDAH, suas características clínicas e os estudos genéticos desse grupo de pacientes, as crianças e adolescentes que apresentam essas doenças psiquiátricas em comorbidade, poderiam ser consideradas como um grupo distinto.

Através do conceito de que o gene *COMT* é um gene modificador, pode-se contextualizar seu efeito dentro do “cenário sináptico” do CPF gerado pelo tratamento do TDAH com MPH. A *COMT* atua na degradação de catecolaminas, possuindo um efeito antagônico ao desse fármaco. Dessa forma, considera-se que esta enzima mantenha uma regulação fina desses neurotransmissores. Contudo, os resultados farmacogenéticos gerados nesse trabalho indicam que o efeito do gene *COMT* é aparentemente pequeno. Apesar de ter sido encontrado um efeito individual do gene e da interação entre o gene e o tempo de tratamento, a melhora clínica dos sintomas de oposição nos dois grupos genotípicos após os três meses é bastante similar. Uma hipótese plausível é que os indivíduos portadores do alelo *Met* melhoram rapidamente, pois no primeiro mês de tratamento melhoram significativamente mais, quando comparados aos pacientes homozigotos para o alelo *Val*. Entretanto, talvez exista um processo compensatório nos homozigotos do alelo *Val* ao longo do tratamento. É possível que o efeito do fármaco seja potencializado e o efeito da enzima *COMT* não seja

tão aparente. Mais estudos são necessários para obtermos respostas mais definitivas sobre esse tema

O conhecimento da real trajetória do TDC, via TDAH, é muito importante clinicamente e, por isso, o entendimento sobre fatores genéticos que contribuem diretamente ao diagnóstico e os processos que mediam a manifestação desses transtornos merecem uma atenção especial. Apesar de existir um risco substancial para o desenvolvimento do comportamento antissocial, nem todos os casos de TDAH evoluem neste caminho e deve-se compreender por que isso ocorre. Em uma perspectiva de continuação desses estudos, salienta-se a necessidade de estudar o gene *COMT* em diferentes amostras: uma composta somente de crianças com TDC; outra com crianças com “TDAH puro”, sem comorbidades; uma terceira de crianças com os dois transtornos simultaneamente; uma quarta composta de indivíduos controle. Dessa forma, podemos tentar distinguir se o papel da *COMT* é diferenciado em crianças com “TDC+TDAH” e se exerce alguma influência nos sintomas antissociais em crianças com TDC sem TDAH. Além disso, seria importante analisar se existe algum efeito da interação entre o gene *COMT* e fatores ambientais na manifestação desses transtornos em comorbidade. Poderíamos tentar replicar os resultados de estudos anteriores, os quais analisaram a interação desse gene com baixo peso do neonato e baixo status socioeconômico (Thapar *et al.*, 2005; Nobile *et al.*, 2009). Conjuntamente, há a possibilidade de incluir outros fatores ambientais ainda não estudados, como fumo durante a gravidez. Outra análise possível é em relação ao efeito do gene *COMT* na melhora de sintomas de oposição que são diretamente ligados ao TC. O TOD parece preceder temporalmente tanto TC quanto depressão e, por isso, autores classificam os oito sintomas de oposição da escala SNAP-IV em três subgrupos: sintomas negativos, indicados como precedentes de depressão; sintomas de oposição propriamente ditos, indicados como precedentes de TC; e sintomas antagônicos, que não foram associados com nenhum transtorno (Burke *et al.*, 2010). Como os estudos do efeito do gene *COMT* são relacionados a sintomas antissociais, possivelmente o efeito farmacogenético desse gene, encontrado nos nossos resultados, possa ser

potencializado se analisarmos somente o subgrupo de sintomas de oposição propriamente dito.

De uma forma geral, a compreensão dos mecanismos genéticos envolvidos no TDAH tem se desenvolvido muito nos últimos anos. Entretanto, a aplicação dos conhecimentos gerados com os estudos moleculares está numa fase ainda precoce. Continua-se longe do conhecimento de toda complexidade da genética desta doença. Para melhorar esse panorama, é necessário entender quais os genes que realmente são importantes, conhecer a neurobiologia da doença, quais as variantes funcionais envolvidas, e de que maneira todos esses fatores influenciam o TDAH. Com a reunião dessas informações, talvez seja possível começar a pensar na aplicação dos resultados obtidos. Esta aplicabilidade pode ser vislumbrada para o futuro através do auxílio no diagnóstico, do aprimoramento dos fármacos existentes e, talvez, do desenvolvimento de novos fármacos. A futura prescrição farmacogenética de medicamentos, focando nos genótipos dos pacientes, poderá possibilitar a otimização da seleção de medicações e de suas doses. E se tais predições de eficácia dos medicamentos, de acordo com o genótipo, irão reduzir o sofrimento e melhorar a qualidade de vida dos pacientes, por enquanto ninguém sabe. Somente através de mais pesquisas essa questão poderá ser respondida. Talvez seja possível identificar as pessoas mais suscetíveis às doenças psiquiátricas, no intuito de manejar as variáveis ambientais. Contudo, estamos ainda no início da montagem desse “quebra-cabeça” e, quem sabe, quando completarmos este quadro complexo e fascinante nós poderemos reverter este conhecimento para benefício direto dos pacientes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- American Psychiatric Association (1994) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Ed. (DSM-IV). Washington: American Psychiatric Association.
- Anderson SW, Bechara A, Damasio H, Tranel D and Damasio AR (1999) Impairment of social and moral behavior related to early damage in human prefrontal cortex. *Nature neurosc* 2: 1032 - 1037.
- Arnsten AFT (2009a) Toward a new understanding of attention-deficit hyperactivity disorder pathophysiology. *CNS Drugs* 23 (S1): 33 – 41.
- Arnsten AFT (2009b) The emerging neurobiology of attention deficit hyperactivity disorder: the key role of the prefrontal association cortex. *J Pediatr* 154: I – S43.
- Arnsten AFT and Li BM (2005) Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biol Psychiatry* 57: 1377-1384.
- Axelrod J and Tomchick R (1958) O-methylation of epinephrine and other catecols. *J Biol Chem* 233: 702-705.
- Banaschewski T, Brandeis D, Heinrich H, Albrecht B, Brunner E and Rothenberger A (2003) Association of ADHD and conduct disorder - brain electrical evidence for the existence of a distinct subtype. *J Child Psychol Psychiatry* 44: 356 - 376.
- Barbosa GA (1995) Transtornos hipercinéticos. *Rev Neuropsiq da Inf e Adol* 3: 12 – 19.
- Barkley RA (2004) Driving impairments in teens and adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychiatr Clin N Am* 27: 233 - 260.
- Barr CL, Wigg K, Malone M, Schachar R, Tannock R and Roberts W (1999) Linkage study of catechol-O-methyltransferase and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet* 88: 710-713.
- Beijsterveldt CEM, Middeldorp CM, Landt MCTS, Bartels M, Hottenga JJ, Suchiman HED, Slagboom PE, Boomsma DI (2011) Influence of Candidate Genes on Attention Problems in Children: A Longitudinal Study. *Behav genet* 41: 155-164.
- Bellgrove MA, Domschke K, Hawi Z, Kirley A, Mullins C, Robertson IH and Gill M (2005) The methionine allele of the COMT polymorphism impairs prefrontal cognition in children and adolescents with ADHD. *Exp Brain res* 163: 352-360.
- Berridge CW, Devilbiss DM, Andrzejewski ME, Arnsten AF, Kelley AE, Schmeichel B, Hamilton C and Spencer RC (2006) Methylphenidate preferentially increases catecholamine neurotransmission within the prefrontal cortex at low doses that enhance cognitive function. *Biol Psychiatry* 60: 1111-1120.

- Biederman J (2005) Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Selective Overview. *Biol Psychiatry* 57: 1215-1220.
- Biederman J and Faraone SV (2005) Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet* 366: 237-248.
- 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.
- Biederman J, Mick E and Faraone SV (2000) Age-dependent decline of symptoms of attention deficit hyperactivity disorder: Impact of remission definition and symptom type. *Am J Psychiatry* 157: 816 - 818.
- Biederman J, Mick E, Faraone SV, Braaten E, Doyle A, Spencer T, Wilens TE, Frazier E and Johnson MA (2002) Influence of gender on attention deficit hyperactivity disorder in children referred to a psychiatric clinic. *Am J Psychiatry* 159: 36 - 42.
- Biederman J, Kim JW, Doyle AE, Mick E, Fagerness J, Smoller JW and 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 Neuropsychiatr Genet* 147B: 1511-1518.
- Burke JD, Hipwell AE and Loeber R (2010) Dimensions of Oppositional Defiant Disorder as Predictors of Depression and Conduct Disorder in Preadolescent Girls. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 49: 484-492.
- Caspi A and Moffitt TE (2006) Gene–environment interactions in psychiatry: joining forces with neuroscience. *Neuroscience* 7: 583 - 590.
- Caspi A, Langley K, Milne B, Moffitt TE, O'Donovan M, Owen MJ, Tomas MP, Poulton R, Rutter M, Taylor A *et al.* (2008) A Replicated Molecular Genetic Basis for Subtyping Antisocial Behavior in Children With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Arch Gen Psychiatry* 65, 203-210.
- Castellanos FX and Tannock R (2002) Neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorder: the search for endophenotypes. *Neuroscience* 3: 617 - 628.
- Chen 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.
- Cheuk DKL 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.
- Connor DF, Steeber J and McBurnett K (2010) A Review of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Complicated by Symptoms of Oppositional Defiant Disorder or Conduct Disorder. *J Dev Behav Pediatr* 31: 427-40.
- Craddock N, Owen MJ and O'Donovan MC (2006) The catechol-O-methyltransferase (COMT) gene as a candidate for psychiatric phenotypes: evidence and lessons. *Mol Psychiatry* 11: 446-458.



- Devilbiss DM and Berridge CW (2008) Cognition-Enhancing Doses of Methylphenidate preferentially Increase Prefrontal Cortex Neuronal Responsiveness. *Biol Psychiatry* 64: 626-635.
- DeYoung CG, Getchell M, Koposov RA, Yrigollen CM, Haeffel GJ, Klinteberg B, Orelund L, Ruchkin VV, Pakstis AJ and Grigorenko EL (2009) Variation in the catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism associated with conduct disorder and ADHD symptoms, among adolescent male delinquents. *Psychiatr Genet* 20: 22-24.
- Diamond A (2007) Consequences of variations in genes that affect dopamine in prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 17: i161-i170.
- Diaz-Asper CM, Weinberger DR and, Goldberg TE (2006) Catechol-O-methyltransferase polymorphisms and some implications for cognitive therapeutics. *NeuroRx* 3, 97-105.
- Dickstein SG, Bannon K, Castellanos FX and Milham MP (2006) The neural correlates of attention deficit hyperactivity disorder: an ALE meta-analysis. *J Child Psychol Psychiatry* 47: 1051 - 1062.
- Durston S, Hulshoff HE, Schnack HG, Buitelaar JK, Steenhuis MP, Minderaa RB, Kahn RS and Van Engeland H (2004) Magnetic Resonance Imaging of Boys With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Their Unaffected Siblings. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 43: 332 - 340.
- Eisenberg J, Mei-Tal G, Steinberg A, Tartakovsky E, Zohar A and Gritsenko I (1999) Haplotype relative risk study of catechol-O-methyltransferase (COMT) and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): Association of the high-enzyme activity Val allele with ADHD impulsive-hyperactive phenotype. *Am J Med Genet* 88: 497-502.
- Elia J, Gai X, Xie HM, Perin JC, Geiger E, Glessner JT, D'arcy M, deBerardinis R, Frackelton E, Kim C *et al.* (2010) Rare structural variants found in attention-deficit hyperactivity disorder are preferentially associated with neurodevelopmental genes. *Molecular Psychiatry* 15: 637–646.
- Epstein JN, Conners CK, Erhard TD, Arnold LE, Hechtman L, Hinshaw SP, Hoza B, Newcorn JH, Swanson JM and Vitiello B (2000) Familial aggregation of ADHD characteristics. *J Abnormal Child Psychol* 28: 585-594.
- Faraone SV and Biederman J (1998) Neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 44: 951-958.
- Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE, Smoller JW, Goralnick JJ, Holmgren MA and Sklar P (2005) Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57: 1313 – 1323.
- Fowler T, Langley K, Rice F, Van den Bree MBM, Ross K, Wilkinson LS, Owen MJ, O'Donovan MC and Thapar A (2009) Psychopathy trait scores in adolescents with childhood ADHD: the contribution of genotypes affecting MAOA, 5HTT and COMT activity. *Psychiatr Genet* 19: 312-319.

- Froehlich TE, McGough JJ and Stein MA (2010) Progress and Promise of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder Pharmacogenetics. *CNS Drugs* 24: 99-117
- Genro JP, Kieling C, Rohde LA and Hutz MH (2010) Attention-deficit/hyperactivity disorder and the dopaminergic hypotheses. *Expert Rev Neurother* 10: 587–601.
- Geyer MA, Swerdlow NR, Mansbach RS and Braff DL (1990) Startle response models of sensorimotor gating and habituation deficits in schizophrenia. *Brain Res Bull* 25: 485–498.
- Giakoumaki SG, Roussos P and Bitsios P (2008) Improvement of Prepulse Inhibition and Executive Function by the COMT Inhibitor Tolcapone Depends on COMT Val158Met Polymorphism. *Neuropsychopharmacology* 33: 3058–3068.
- Gizer IR, Ficks C and Waldman ID (2009) Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet* 126: 51–90.
- Gogos JA, Morgan M, Luine V, Santha M, Ogawa S, Pfaff D and Karayiorgou M (1998) Catechol-O-methyltransferase-deficient mice exhibit sexually dimorphic changes in catecholamine levels and behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9991-9996.
- Goldman LS, Genel M, Bezman RJ and Slanetz PJ (1998) Diagnosis and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents. Council on Scientific Affairs, American Medical Association. *Jama* 279: 1100-1107.
- Goldstein DB, Need AC, Singh R and Sisodiya SM (2007) Potential genetic causes of heterogeneity of treatment effects. *The Am J of Med* 120: S21-S25.
- Hamilton, SS and Armando J (2008) Oppositional Defiant Disorder. *Am Fam Physician* 78: 861-866.
- Harrison PJ and Tunbridge EM (2007) Catechol-O-methyltransferase (COMT): A gene contributing to sex differences in brain function, and to sexual dimorphism in the predisposition to psychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology* 33: 3037-3045.
- Hawi Z, Millar N, Daly G, Fitzgerald M and Gill M (2000) No association between catechol-O-methyltransferase (COMT) gene polymorphism and ADHD in an Irish sample. *Am J Med Genet* 96: 241-243.
- Indredavik MS, Vik T, Heyerdahl S, Kulseng S and Brubakk A (2004) Psychiatric symptoms in low birth weight adolescents, assessed by screening questionnaires. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 14: 226–236.
- Jiang H, Xie T, Ramsden DB and Ho SL (2003) Human catechol-O-methyltransferase down-regulation by estradiol. *Neuropharmacology* 45: 1011-1018.
- Kennard MA, Spencer S and Fountain JG (1941) Hyperactivity in monkeys following lesions of the frontal lobes. *J Neurophysiology* 4: 512 - 524.

- Kereszturi E, Tarnok Z, Bognar E, Lakatos K, Farkas L, Gadoros J, Sasvari-Szekely M and Nemoda Z (2007) Catechol-O-Methyltransferase Val158Met Polymorphism Is Associated With Methylphenidate Response in ADHD Children. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B: 1431-1435.
- Lachman HM (2008) Does COMT Val158Met affect behavioral phenotypes: Yes, No, Maybe? *Neuropsychopharmacology* 33: 3027-3029.
- Langley K, Holmans PA, Van den Bree MBM and Thapar A (2007) Effects of low birth weight, maternal smoking in pregnancy and social class on the phenotypic manifestation of Attention Deficit Hyperactivity Disorder and associated antisocial behaviour: investigation in a clinical sample. *BMC Psychiatry* 7: 26 – 33.
- Levy F (1991) The dopamine theory of attention-deficit-hyperactivity disorder (ADHD). *Aust N Z J Psychiatry* 25: 277-283.
- Levy F, Barr C and Sunohara G (1998) Directions of aetiologic research on attention-deficit/hyperactivity disorder. *Aust N Z J Psychiatry* 32: 97-103.
- Lotta T, Vidgren J, Tilgmann C, Ulmanen I, Melen K, Julkunen I and Taskinen J (1995) Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochemistry* 34: 4202-4210.
- Manor I, Kotler M, Sever Y, Eisenberg J, Cohen H and Ebstein RP (2000) Failure to replicate an association between the catechol-O-methyltransferase polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder in a second, independently recruited Israeli cohort. *Am J Med Genet* 96: 858-860.
- Manuzza S, Klein RG and Moulton JL (2003) Persistence of attention-deficit/hyperactivity disorder into adulthood: What have we learned from the prospective follow-up studies? *J Atten Disord* 7: 93 - 100.
- Matsumoto M, Weickert CS, Akil M, Lipska BK, Hyde TM, Herman MM, Kleinman JE and Weinberger DR (2003) Catechol-O-methyltransferase mRNA expression in human and rat brain: evidence for a role in cortical neuronal function. *Neuroscience* 116: 127–137.
- McGough JJ (2005) Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Pharmacogenomics. *Biol Psychiatry* 57: 1367-1373.
- Mick E and Faraone SV (2008) Genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 17: 261-284.
- 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.
- Mier D, Kirsch P and Meyer-Lindenberg A (2009) Neural substrates of pleiotropic action of genetic variation in COMT: a meta-analysis. *Mol Psychiatry*: 1-10.
- Monuteaux MC, Biederman J, Doyle AE, Mick E and Faraone SV (2009) Genetic risk for conduct disorder symptom subtypes in an ADHD sample: specificity to aggressive symptoms. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 48: 757 - 764.

- MTA Cooperative Group (1999) A 14-month randomized clinical trial of treatment strategies for attention-deficit/hyperactivity disorder. The MTA Cooperative Group. Multimodal Treatment Study of Children with ADHD. *Arch Gen Psychiatry* 56: 1073-1086.
- Nigg JT and Goldsmith HH (1998) Developmental psychopathology, personality, and temperament: Reflections on recent behavioral genetics research. *Hum Biol* 70: 387-412.
- Nigg JT, Nikolas M and Burt A (2010) Measured gene-by-environment interaction in relation to attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 49: 863-873.
- Nobile M, Rusconi M, Bellina M, Marino C, Giorda R, Carlet O, Vanzin L, Molteni M and Battaglia M (2009) COMT Val<sup>158</sup>Met polymorphism and socioeconomic status interact to predict attention deficit/hyperactivity problems in children aged 10-14. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 19: 549-557.
- Payton A *et al.* (2001) Examining for association between candidate gene polymorphisms in the dopamine pathway and attention-deficit hyperactivity disorder: a family based study. *Am J Med Genet* 105: 464–470.
- Pliszka SR (2005) The neuropsychopharmacology of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57: 1385-1390.
- Polanczyk G, De Lima MS, Horta BL, Biederman J and Rohde LA (2007) The worldwide prevalence of ADHD: A systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry* 164: 942 – 948.
- Polanczyk G, Zeni C, Genro JP, Roman T, Hutz MH and Rohde LA (2005) Attention-deficit/hyperactivity disorder: advancing on pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 6: 225-234.
- Prince J (2008) Catecholamine dysfunction in attention-deficit/hyperactivity disorder: an update. *J Clin Psychopharmacol* 28: S39-S45.
- 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.
- Qian Q, Liu J, Wang YF, Yang L, Guan LL and Faraone S (2009) Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder comorbid oppositional defiant disorder and its predominately inattentive type: evidence for an association with COMT but not MAOA in a chinese sample. *Behavioral and Brain Functions* 5: 8 - 14.
- Raine A (2002) Annotation: The role of prefrontal deficits, low autonomic arousal, and early health factors in the development of antisocial and aggressive behavior in children. *J Child Psychol Psychiatry* 43: 417-434.
- Rodrigues LT, Rohde LA, Roman T, Schmitz M, Polanczyk G, Zeni C, Marques FZC, Contini V, Grevet EH, Belmonte-de-abreu P *et al.* (2011) Is there a role for rare variants in *DRD4* gene in the susceptibility for ADHD? Searching for an effect of allelic heterogeneity. *Mol Psychiatry* [*in press*].

- Rohde LA, Biederman J, Busnello EA, Zimmermann H, Schmitz M, Martins S and Tramontina S (1999) ADHD in a school sample of Brazilian adolescents: a study of prevalence, comorbid conditions, and impairments. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 38: 716 - 722.
- Rohde LA, Barbosa G, Tramontina S and Polanczyk G (2000) Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade. *Rev Bras Psiquiatr* 22: 7 – 11.
- Rutter M, Cox A, Tupling C, Berger M and Yule W (1975) Attainment and adjustment in two geographical areas. I - The prevalence of psychiatric disorder. *Brit J Psychiatr* 126: 493 - 509.
- Sengupta S, Grizenko N, Schmitz N, Schwartz G, Bellingham J, Polotskaia A, Stepanian MT, Goto Y, Grace AA and Joober R (2008) *COMT Val<sup>108/158</sup> Met* Polymorphism and the Modulation of Task-Oriented Behavior in Children with ADHD *Neuropsychopharmacology* 33: 3069-3077.
- Serra-Pinheiro MA, Mattos P, Souza I, Pastura G and Gomes F (2004) The effect of methylphenidate on oppositional defiant disorder comorbid with attention deficit/hyperactivity disorder. *Arq Neuropsiquiatr* 62: 399-402.
- Shaw P, Eckstrand K, Sharp W, Blumenthal J, Lerch JP, Greenstein D, Clasen L, Evans A, Giedd J and Rapoport JL (2007) Attention-deficit/hyperactivity disorder is characterized by a delay in cortical maturation. *PNAS* 104: 19649 – 19654.
- Smalley SL, McCough JJ, Del'Homme M, Newdeman J, Gordon E, Kim T, Liu A and McCracken JT (2000) Familial clustering of symptoms and disruptive behaviors in multiple families with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 39: 1135-1143.
- Solanto MV (1998) Neuropsychopharmacological mechanisms of stimulant drug action in attention-deficit hyperactivity disorder: a review and integration. *Behav Brain Res* 94: 127-152.
- Solanto MV (2002) Dopamine dysfunction in AD/HD: integrating clinical and basic neuroscience research. *Behav Brain Res* 130: 65-71.
- Sprich S, Biederman J, Crawford MH, Mundy E and Faraone SV (2000) Adoptive and biological families of children and adolescents with ADHD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 39: 1432-1437.
- Steinhausen CH (2009) The heterogeneity of causes and courses of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Acta Psychiatr Scand* 120: 392–399.
- Stergiakouli E and Thapar A (2010) Fitting the pieces together: current research on the genetic basis of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Neuropsychiatr Dis Treat* 7: 551-560.
- Still GF (1902) Some abnormal psychological conditions in childhood. *Lancet* 1: 1008.
- Swanson JM, Sergeant JA, Taylor E, Sonuga-Barke EJS, Jensen PS and Cantwell DP (1998) Attention-deficit hyperactivity disorder and hyperkinetic disorder. *Lancet* 351: 429 - 433.

- Swanson JM, Kinsbourne M, Nigg J, Lanphear B, Stefanatos GA, Volkow N, Taylor E, Casey BJ, Castellanos FX, Wadhwa PD (2007) Etiologic Subtypes of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: Brain Imaging, Molecular Genetics and Environmental Factors and the Dopamine Hypothesis. *Neuropsychol Rev* 17:39–59.
- Taerk E, Grizenko N, Ben Amor L, Lageix P, Mbekou V, Deguzman R, Torkaman-Zehi A, Sstepanian MT, Baron C and Joobor R (2004) Catechol-O-methyltransferase (COMT) Val<sup>108/158</sup>met polymorphism does not modulate executive function in children with ADHD. *BMC Med Genet* 5: 30.
- Tahir E, Curran S, Yazgan Y, Ozbay F, Cirakoglu B and Asherson PJ (2000) No association between low and high activity catecholamine-methyl-transferase (COMT) and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in a sample of Turkish children. *Am J Med Genet* 96: 285-288.
- Tenhunen J, Salminen M, Jalanko A, Ukkonen S and Ulmanen I (1993) Structure of the rat catechol-O-methyltransferase gene: separate promoters are used to produce mRNAs for soluble and membrane-bound forms of the enzyme. *DNA and cell biology* 12: 253-263.
- Tenhunen J, Salminen M, Lundström K, Kiviluoto T, Savolainen R and Ulmanen I (1994) Genomic organization of the human catechol-O-methyltransferase gene and its expression from two distinct promoters. *Eur J Biochem* 223: 1049-1059.
- 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, Harrington R and McGuffin P (2001) Examining the comorbidity of ADHD-related behaviours and conduct problems using a twin study design. *British J Psychiatry* 179: 224 – 229.
- Thapar A, Langley K, Fowler T, Rice F, Turic D, Whittinger N, Aggleton J, Van-den-Bree M, Owen M and O'Donovan M (2005) Catechol O-Methyltransferase Gene Variant and Birth Weight Predict Early-Onset Antisocial Behavior in Children With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Arch Gen Psychiatry* 62: 1275-1278.
- Thapar A, Van den Bree M, Fowler T, Langley K and Whittinger N (2006) Predictors of antisocial behaviour in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 15: 118 - 125.
- 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. *Brit J Psych* 190: 1-3.
- Thapar A, Rice F, Hay D, Boivin J, Langley K, Van den Bree M, Rutter M, and Haro G (2009) Prenatal Smoking Might Not Cause Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: Evidence from a Novel Design. *Biol Psychiatry* 66: 722–727.

- Tunbridge EM, Harrison PJ and Weinberger DR (2006) Catechol-o-Methyltransferase, Cognition, and Psychosis: Val<sup>158</sup>Met and Beyond. *Biol Psychiatry* 60: 141-151.
- Turic D *et al.* (2005) A family based study of catechol-O-methyltransferase (COMT) and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 133: 64–67.
- Valera EM, Faraone SV, Murray KE and Seidman LJ (2007) Meta-Analysis of Structural Imaging Findings in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Biol Psychiatry* 61: 1361 – 1369.
- Vles JS, Feron FJ, Hendriksen JG, Jolles J, van Kroonenburgh MJ and Weber WE (2003) Methylphenidate down-regulates the dopamine receptor and transporter system in children with attention deficit hyperkinetic disorder (ADHD). *Neuropediatrics* 34: 77-80.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS and Ding YS (2005) Imaging the effects of methylphenidate on brain dopamine: New model on its therapeutic actions for Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Biol Psychiatry* 57: 1410-1415.
- Wender PH, Wolf LE and Wasserstein J (2001) Adults with ADHD - An overview. *Ann N Y Acad Sci* 931: 1-16.
- Wilens TE (2008) Effects of methylphenidate on the catecholaminergic system in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychopharmacol* 28: S46-53.
- Wilens TE and Dodson W (2004) A clinical perspective of attention-deficit/hyperactivity disorder into adulthood. *J Clin Psychiatry* 65: 1301 – 1313.
- Zhang XN *et al.* (2003) Association analysis between attention-deficit hyperactivity disorder and Val158Met polymorphism of catechol-O-methyltransferase gene. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 20: 322–324.
- Zhou *et al.* (2008) Meta-Analysis of Genome-Wide Linkage Scans of Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 147B: 1392–1398.