

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

**EXOCITOSE DE NEUROTRANSMISSORES E RESPOSTA AO  
TRATAMENTO DO TDAH COM METILFENIDATO:  
UMA ABORDAGEM TRANSLACIONAL**

**BRUNA SANTOS DA SILVA**

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

**Orientador: Prof. Dr. Claiton Henrique Dotto Bau**  
**Coorientadora: Prof. Dra. Verônica Contini**

Porto Alegre, março de 2019.

## INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

---

A presente Tese de Doutorado foi desenvolvida no Laboratório de Genética Humana Molecular do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Atividades complementares foram desenvolvidas por um período de 6 meses no *Laboratory of Translational Psychiatry, Universitätsklinikum*, Frankfurt, Alemanha.

A aluna recebeu bolsa de estudos concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e, durante os 6 meses que desenvolveu atividades de pesquisa na Alemanha, um adicional mensal concedido pelo *Deutscher Akademischer Austauschdienst* (DAAD).

As instituições governamentais que fomentaram a presente Tese de Doutorado foram: (1) CNPq (466722/2014-1 e 424041/2016-2), (2) Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (código 0001) e (3) DAAD (57417991).

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

Theodore Roosevelt

“Eu prefiro a crítica mais afiada de um único homem inteligente à aprovação impensada das massas”

Johannes Kepler

## AGRADECIMENTOS

---

Sou muito grata às pessoas que fazem parte da minha trajetória acadêmica. Não é comum poder chamar seus colegas de trabalho de amigos, e eu tenho essa sorte. Cada um com sua especialidade, seja nas discussões na salinha 109 ou na mesa do bar, me ajudaram pessoal e profissionalmente a chegar até aqui. Somos a “Matilha do Claiton”, e sim, andamos em bando e somos muito unidos. O nome peculiar não é um completo devaneio de algum dia esgotante de trabalho (ou talvez seja). O fato é que tenho muito orgulho de fazer parte desse grupo de profissionais excepcionais e muito capacitados, que fazem da ciência um mundo muito mais interessante.

Essencial não só na minha vida pessoal, mas também profissional, é o meu noivo; por ser compreensivo e ficar escutando meus assuntos científicos sem entender nada, mas se esforçar para isso. Ao menos ele já sabe o que é um SNP ou um GWAS. Ele é o principal responsável por me fazer conseguir conciliar trabalho e diversão; respeita os finais de semana trabalhados, mas também se preocupa em me tirar de casa para relaxar.

Agradeço também aos meus pais e minhas irmãs, pessoas maravilhosas das quais eu me orgulho muito e são modelos de inspiração para a minha vida, e que foram fundamentais pro meu crescimento e me fizeram ser quem sou hoje. Tenho muita sorte de ter pessoas tão especiais como parte da minha família. E mesmo que estejam distantes fisicamente, sei que estarão sempre torcendo por mim e ao meu lado sempre que eu precisar.

Deixo meus agradecimentos também ao PPGBM, e todos os seus membros, por ser esse programa de excelência do qual eu me orgulho de fazer parte. Em especial, ao meu orientador, pelos muitos ensinamentos e discussões, e principalmente por ser presente, estando sempre disponível para conversar, qualquer que seja o assunto, e cuja dedicação foi essencial para o meu crescimento profissional; à minha co-orientadora por toda a colaboração nessa caminhada, bem como todo o grupo PRODAH-A/HCPA. Não posso deixar de agradecer também às instituições financiadoras nacionais e internacionais que viabilizaram todo esse trabalho e oportunizaram a realização de um doutorado sanduíche, que foi muito importante para o meu crescimento acadêmico, e também pessoal, por todas as experiências vividas e por conhecer pessoas que me receberam muito bem, contribuindo muito para tornar essa experiência ainda melhor.

MUITO OBRIGADA!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS .....</b>	<b>9</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>11</b>
<b>CAPÍTULO I - Introdução .....</b>	<b>12</b>
1.1. Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade: Aspectos gerais.....	13
1.2. Neurobiologia do TDAH .....	15
1.2.1. Neuroquímica do TDAH.....	16
1.2.2. Exocitose de neurotransmissores e o TDAH.....	17
1.3. Fatores etiológicos ambientais para o TDAH.....	19
1.4. Fatores etiológicos genéticos para o TDAH .....	20
1.4.1. Estudos de ligação .....	20
1.4.2. Estudos de gene candidato .....	21
1.4.3. Estudos de associação por varredura genômica .....	22
1.5. Alterações proteômicas no TDAH.....	23
1.6. Tratamento do TDAH.....	26
1.6.1 Considerações sobre o tratamento em adultos .....	26
1.6.2. Metilfenidato (MPH) – principal estimulante utilizado no tratamento do TDAH .....	27
1.6.2.1. Farmacocinética do MPH .....	28
1.6.2.2. Mecanismo de ação do MPH.....	30
1.6.2.3. Evidências adicionais relacionadas às ações do MPH.....	32
1.6.2.4. Efeitos do MPH na expressão de genes e proteínas .....	34
1.6.2.5. Alterações em regiões cerebrais induzidas por MPH .....	35
1.6.2.6. Fatores genéticos associados à susceptibilidade da resposta ao MPH .....	37
<b>CAPÍTULO II – Justificativa e Objetivos .....</b>	<b>41</b>
2.1. Justificativa .....	42
2.2. Objetivos.....	43
2.2.1. Objetivo geral.....	43
2.2.2. Objetivos específicos.....	43
2.2.3. Objetivos complementares .....	43

<b>CAPÍTULO III - Exocytosis-related genes and response to methylphenidate treatment in adults with ADHD .....</b>	<b>44</b>
<b>CAPÍTULO IV - Neurotransmitter exocytosis pathways and response to methylphenidate treatment in adults with ADHD .....</b>	<b>57</b>
Introduction.....	60
Methods .....	61
Results.....	64
Discussion.....	65
References.....	69
Supplementary Material.....	78
<b>CAPÍTULO V - Differential proteomics of methylphenidate treatment reveals a potential link between synaptic neurotransmission and variability of therapeutic response .....</b>	<b>88</b>
Introduction.....	91
Methods .....	92
Results.....	97
Discussion.....	98
References.....	104
Supplementary Material.....	113
<b>CAPÍTULO VI - The association between SYT1-rs2251214 and cocaine use disorder further supports its role in psychiatry .....</b>	<b>124</b>
Introduction.....	128
Material and Methods .....	129
Results.....	131
Discussion.....	132
Conclusion .....	134
References.....	136
Supplementary Material.....	144
<b>CAPÍTULO VII – Dados e projetos complementares.....</b>	<b>147</b>
7.1. Análise proteômica das alterações induzidas por MPH no córtex de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). .....	148
7.1.1. Introdução.....	148

7.1.2. Objetivos .....	149
7.1.3. Metodologia .....	150
7.1.4. Andamento do projeto e perspectivas .....	150
7.2. Efeitos do MPH e da super-expressão de <i>Syt1</i> na morfologia dendrítica de neurônios primários .....	151
7.2.1. Introdução.....	151
7.2.2. Objetivo.....	155
7.2.3. Metodologia .....	155
7.2.4. Andamento do projeto e perspectivas .....	159
<b>CAPÍTULO VIII – Discussão geral .....</b>	<b>162</b>
8.1. Abordagem de gene-candidato .....	165
8.2. Abordagem genômica (análises de <i>gene-sets</i> definidos a priori).....	167
8.3. Abordagem integrativa proteômica-genômica.....	169
8.4. Considerações finais .....	171
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>173</b>
<b>CAPÍTULO IX – Produções científicas adicionais.....</b>	<b>193</b>
9.1 Relacionadas ao tema da Tese .....	194
9.1.1. Artigo Publicado 1 .....	194
9.1.2. Artigo Publicado 2 .....	195
9.1.3. Artigo publicado 3.....	196
9.1.4. Artigo submetido.....	197
9.1.5. Capítulo de livro no prelo.....	198
9.2. Não relacionadas ao tema da Tese .....	220
9.2.1. Artigo Publicado 4 .....	220
9.2.2. Artigo publicado 5.....	221
9.2.3. Artigo publicado 6.....	222
9.2.4. Artigo publicado 7.....	223
9.2.5. Artigo publicado 8.....	224
9.2.6. Artigo publicado 9.....	225
9.2.7. Artigo publicado 10.....	226

<b>ANEXOS .....</b>	<b>227</b>
Anexo I – Critérios diagnósticos do DSM-5 para o TDAH .....	228
Anexo II – Escala ASRS (Adult self-report scale) .....	230
Anexo III – Escala SNAP-IV (Swanson, Nolan, and Pelham scale version 4) .....	232
Anexo IV- Escalas CGI-S e CGI-I (Clinical Global Impression – Severity / Improvement scales).....	233
Anexo V - Aprovação – Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde – HCPA (A).....	234
Anexo VI – Aprovação - Comissão de Ética Para o Uso de Animais - HCPA .....	235
Anexo VII – Aprovação – Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde – HCPA (B) .....	236
Anexo VIII - Aprovação Comissão de Ética em Pesquisa da PUCRS .....	237



## LISTA DE ABREVIATURAS

---

AAV	Vírus adeno-associado
ADRA2A	<i>Adrenoceptor alpha 2A</i>
CPF	Córtex pré-frontal
COMT	<i>Catechol-o-methyltransferase</i>
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
DRD4	Dopamine receptor D4
DSM	Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais
EAGLE	<i>Early Genetics and Lifecourse Epidemiology</i>
GWAS	Estudo de associação por varredura genômica
HBSS	Solução salina tamponada Hank
iPSYCH	<i>Lundbeck Foundation Initiative for Integrative Psychiatric Research</i>
LTD	Depressão de longa duração
LTP	Potenciação de longa duração
MPH	Metilfenidato
NE	Noradrenalina
NET	Transportador de noradrenalina
PGC	<i>Psychiatric Genomics Consortium</i>
SAGA	<i>Study of ADHD trait genetics in adults</i>
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SNAP25	<i>Synaptosomal-associated protein 25</i>
SNARE	<i>N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors</i>
STX	<i>Syntaxin</i>
STXBP	<i>Syntaxin-binding protein</i>
SYT	<i>Synaptotagmin</i>
TDAH	Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade
VAMP	<i>Vesicle-associated membrane protein</i>
VGaT	Transportadores vesiculares para o armazenamento de GABA
VGlut2	Transportadores vesiculares para o armazenamento de glutamato
VMAT-2	<i>Vesicular amine transporter 2</i>
VNTR	Número variável de repetições em tandem
WKY	Wistar-Kyoto

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

---

**Tabela 1.** Publicações de estudos farmacogenéticos em adultos com TDAH.

**Figura 1.** Formação do complexo SNARE no neurônio pré-sináptico para a liberação de neurotransmissores.

**Figura 2.** Vias metabólicas do metilfenidato em humanos.

**Figura 3.** Mecanismo de ação do metilfenidato.

**Figura 4.** Mecanismo de ação alternativo proposto para metilfenidato, cocaína e compostos relacionados.

**Figura 5.** Plasticidade estrutural mediada por atividade.

**Figura 6.** Características geométricas para a identificação dos espinhos dendríticos.

**Figura 7.** Representação esquemática da estratégia utilizada para a construção do vetor plasmidial expressando *Syt1*.

**Figura 8.** Ilustração esquemática do protocolo para produção e purificação de vetores virais adeno-associados (AAV).

**Figura 9.** Neurônio de hipocampo controle positivo para imunofluorescência eGFP.

**Figura 10.** Neurônio de hipocampo infectado com o vetor viral expressando *Syt1* (fluorescência positiva para mCherry).

## RESUMO

---

O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) representa um problema com relevante impacto social e econômico quando não tratado adequadamente, pois está associado a desfechos adversos que causam prejuízos importantes para a qualidade de vida. O metilfenidato (MPH) é o medicamento de primeira escolha para o seu tratamento. No entanto, apesar de demonstrar eficácia no alívio dos sintomas, uma proporção considerável dos pacientes não apresenta resposta sintomatológica adequada e/ou interrompe o tratamento precocemente. A via da exocitose de neurotransmissores, em especial o complexo SNARE, tem se destacado como candidata promissora para o envolvimento tanto na neurobiologia do TDAH quanto nas ações do MPH. Assim, a presente Tese busca investigar com uma perspectiva translacional a resposta ao MPH no tratamento do TDAH, tendo como foco principal os mecanismos de exocitose de neurotransmissores. Múltiplas abordagens integradas e complementares entre ciência básica e clínica compõem o conjunto de dados. As abordagens incluem gene candidato e genômica para a avaliação de vias candidatas em resposta ao MPH em uma amostra clínica, bem como proteômica em modelo animal tratado com MPH. Além disso, dados complementares incluem uma análise genética do papel de um componente do complexo SNARE no transtorno por uso de cocaína (estimulante com alvos moleculares compartilhados com o MPH). O conjunto geral de resultados sugere que a variabilidade genética em vias de exocitose de neurotransmissores influencia a resposta ao MPH, o qual, por sua vez, modula a expressão de proteínas desse sistema. Esse conjunto de evidências, somado a achados prévios, demonstrando o envolvimento de uma via biológica por diferentes perspectivas é singular no contexto da psiquiatria. Esses resultados são úteis para guiar estudos adicionais na busca pela identificação de preditores para a personalização do tratamento e desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. No entanto, eles já constituem por si próprios um passo significativo no entendimento das bases biológicas do TDAH e do seu tratamento. O esclarecimento dos mecanismos biológicos tanto para os profissionais da saúde quanto para os pacientes representa sabidamente um reforço significativo na motivação para a busca do tratamento e sua aderência, além de contribuir para os esforços que visam à desmistificação do problema e universalização do tratamento.

## ABSTRACT

---

Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) has a relevant social and economic impact if not adequately treated since it is associated with adverse outcomes that impair the quality of life significantly. Methylphenidate (MPH) is the first-line pharmacological treatment, and it is efficacious in attenuating ADHD symptoms. However, a considerable proportion of patients do not present an satisfactory response and/or discontinue treatment over time. The neurotransmitter exocytosis pathways, especially the SNARE complex, have emerged as promising candidates for the involvement in both the neurobiology of ADHD and MPH actions. Therefore, this Thesis aims to explore the response to MPH in the treatment of ADHD with a translational perspective, focusing mainly on neurotransmitter exocytosis mechanisms. Multiple integrated and complementary approaches between basic and clinical science comprise the data. Candidate gene and genomic approaches are included to evaluate candidate pathways in MPH response using a clinical sample, as well as proteomics of an animal model treated with MPH. Besides, complementary data involves a genetic analysis evaluating the role of a component of the SNARE complex in cocaine use disorder (stimulant with molecular targets shared with MPH). The overall results suggest that the genetic variability in neurotransmitter exocytosis pathways influence the response to MPH, which, in turn, modulates the protein expression of this system. This set of evidence, combined with previous findings, demonstrating the involvement of a biological pathway from different perspectives is distinctive in the context of psychiatry. These results are useful to guide further studies searching for the identification of predictors for personalized treatment and the development of new therapeutic approaches. Nonetheless, they already represent a relevant step to comprehend the biological basis of ADHD and its treatment. The understanding of the biological mechanisms by both health professionals and patients characterizes a significant reinforcement in the motivation to seek treatment and to its adherence, as well as contributes to the efforts for the demystification of the problem and universalization of treatment.

# CAPÍTULO I

---

Introdução

### **1.1. Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade: Aspectos gerais**

O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) é uma condição psiquiátrica do neurodesenvolvimento muito comum, com prevalência estimada em 5,3% em crianças e adolescentes (Polanczyk et al. 2007) e 2,5% em adultos (Simon et al. 2009). Esse transtorno é caracterizado por um padrão persistente de desatenção, hiperatividade e impulsividade (APA 2013). A desatenção refere-se à dificuldade de manter o foco, desorganização, falta de persistência no desenvolvimento de tarefas, sendo que esses sintomas não são decorrentes de um desafio ou falta de compreensão. A hiperatividade está relacionada à atividade motora excessiva, como inquietude extrema e fala em excesso. E a impulsividade manifesta-se por ações precipitadas e dificuldade de autocontrole.

A validade do diagnóstico do TDAH é por vezes alvo de críticas que sugerem que ele estaria principalmente relacionado a questões culturais envolvendo as exigências da sociedade atual e que a oferta de tratamento se daria em prol da indústria farmacêutica. No entanto, desde a Grécia Antiga são relatadas características fenotípicas compatíveis com os critérios diagnósticos atuais do TDAH. A existência de tais relatos em diferentes culturas e momentos históricos evidencia que o TDAH não é uma consequência da cultura atual (Victor et al. 2018; ver capítulo IX - item 9.2.6). Independentemente do debate sobre a validade do diagnóstico, é inquestionável que os sintomas relacionados ao TDAH causam prejuízos que podem ser atenuados com o seguimento de um tratamento adequado. Dessa forma, o reconhecimento do TDAH como um transtorno psiquiátrico válido é vantajoso para os pacientes, pois permite a busca por um tratamento capaz de mitigar o prejuízo causado pelos sintomas. Quanto ao tratamento, apesar dos milênios de reconhecimento do problema, apenas nos últimos anos surgiram condições de integrar diferentes abordagens moleculares de pesquisa capazes de fazer face à enorme complexidade do tema.

Atualmente, diagnóstico de TDAH segue a 5ª edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5). Para que os critérios diagnósticos sejam preenchidos em adultos (ver Anexo I), ao menos 5 sintomas devem estar presentes, os quais devem causar prejuízo em mais de um contexto ambiental (em casa, na escola ou no trabalho, por exemplo) com duração de no mínimo seis meses. Além disso, uma apresentação clínica substancial desses sintomas deve ter sido percebida antes dos doze anos de idade (APA 2013). O DSM-5 reconhece três apresentações para o TDAH, de acordo com os sintomas observados: (1) apresentação combinada, se os critérios para

ambos os sintomas de desatenção e hiperatividade/impulsividade forem preenchidos; (2) apresentação predominantemente desatenta, se apenas os critérios de desatenção forem preenchidos; e (3) apresentação predominantemente hiperativa/impulsiva, se apenas os critérios de hiperatividade/impulsividade forem preenchidos (APA 2013).

Os prejuízos decorrentes dos sintomas de TDAH têm um impacto funcional significativo nas atividades diárias dos pacientes, afetando o sucesso acadêmico e/ou profissional, e estão relacionados a várias adversidades (Shaw et al. 2012). Por exemplo, crianças e adolescentes com TDAH apresentam maior risco de lesões acidentais (Ruiz-Goikoetxea et al. 2018), problemas nas relações com os pais e colegas (Johnston and Mash 2001; Kim et al. 2015), e pior desempenho escolar (Loe and Feldman 2007). Em adolescentes, os principais desfechos negativos envolvem uso precoce e mais frequente de cigarro, maconha e outras drogas (Upadhyaya 2008). Adultos com TDAH sofrem acidentes de trânsito com maior frequência (Chang et al. 2014), e apresentam menor escolaridade e pior desempenho no trabalho (Biederman et al. 2008). Outros desfechos negativos ao longo da vida incluem o abuso de substâncias (Dalsgaard et al. 2014), criminalidade (Mohr-Jensen and Steinhausen 2016), morte prematura (Dalsgaard et al. 2015), pior qualidade de vida (Lee et al. 2016), problemas nas relações sociais e baixa autoestima (Shaw et al. 2012).

A classificação atual dos sintomas centrais do TDAH permite o agrupamento de quadros clínicos mais homogêneos; no entanto, existe uma alta variabilidade no perfil de sintomas, níveis de prejuízo, fatores agravantes, déficits neuropsicológicos e causas subjacentes em pacientes com TDAH (Steinhausen 2009; Garner et al. 2013; Mostert et al. 2015), o que dificulta tanto o diagnóstico quanto o tratamento. Testes neuropsicológicos podem ser úteis como ferramentas auxiliares ao diagnóstico considerando que a presença do transtorno está relacionada ao pior desempenho em testes de funções executivas e cognitivas, como os de atenção sustentada, velocidade de resposta, vigilância e memória de trabalho (Willcutt et al. 2005; Nikolas et al. 2019). A utilização de vários testes neuropsicológicos em conjunto com outras medidas clínicas pode auxiliar na identificação de indivíduos com TDAH, no entanto, eles apresentam pouco valor diagnóstico até o momento (Nikolas et al. 2019). Sua utilidade representa uma maior importância para a identificação das áreas para as quais o paciente apresenta maior prejuízo, e assim pode ser de grande valia para guiar a estratégia de tratamento, seja ele farmacológico ou não.

Outro fator que contribui para a heterogeneidade clínica observada no TDAH é a alta prevalência de comorbidades associadas. Em torno de 50-60% das crianças com TDAH apresentam algum outro transtorno psiquiátrico, sendo os mais comuns o transtorno de oposição desafiante, transtorno de conduta e transtornos de ansiedade e aprendizagem (Pingali and Sunderajan 2014; Jensen and Steinhausen 2015; Reale et al. 2017). Em adultos, dentre as comorbidades mais comuns estão os transtornos de ansiedade, de humor, de personalidade, bem como o transtorno por uso de substâncias (Kessler et al. 2006; Fayyad et al. 2007; Katzman et al. 2017). A presença de outros transtornos psiquiátricos associados influencia negativamente o prognóstico do paciente e pode exacerbar os desfechos negativos (Katzman et al. 2017). Além disso, a utilização de outros medicamentos psicotrópicos para o tratamento dessas comorbidades também constitui um fator importante para o curso e tratamento do TDAH.

Os dados genômicos corroboram essa associação observada clinicamente entre os transtornos através de uma análise da herdabilidade compartilhada entre os principais transtornos mentais. Esse estudo foi realizado através do *The Brainstorm Consortium* com base em dados de meta-análises de estudos de associação por varredura genômica (GWAS), e compreende 25 transtornos (10 psiquiátricos e 15 neurológicos). Os resultados demonstraram que os transtornos psiquiátricos compartilham entre si uma proporção considerável de suas variantes genéticas comuns de risco, principalmente entre TDAH, esquizofrenia, transtorno depressivo maior, transtorno bipolar e transtornos de ansiedade. Por outro lado, os transtornos neurológicos parecem ter um *background* genético mais distinto, com suas variantes genéticas comuns de risco apresentando correlação baixa com as dos transtornos psiquiátricos (Brainstorm Consortium. Anttila et al. 2018).

## **1.2. Neurobiologia do TDAH**

A heterogeneidade clínica do TDAH dificulta a interpretação dos resultados de estudos que buscam o entendimento das especificidades neurobiológicas do transtorno e também a identificação de possíveis biomarcadores para o transtorno. Nesse sentido, exames de neuroimagem são considerados ferramentas promissoras para a elucidação dessa complexidade neurobiológica e para a identificação de possíveis biomarcadores relacionados ao TDAH. Os estudos realizados até o momento apontam, de maneira geral, para a existência de alterações estruturais e funcionais em regiões cerebrais de pacientes



com TDAH, os quais apresentam de maneira geral maturação cortical atrasada e hipoatividade no córtex pré-frontal (CPF) bem como conexões fronto-estriatais alteradas (Cortese and Castellanos 2012; Hoogman et al. 2017; Klein et al. 2017b; Klein et al. 2017a). Para uma revisão mais detalhada dos achados com neuroimagem ver capítulo IX - item 9.1.5. No entanto, considerando a etiologia multifatorial do TDAH, para um biomarcador ser considerado útil para a prática clínica provavelmente deverá incorporar domínios múltiplos de medida. Até o momento, não existem marcadores biológicos que possam ser utilizados clinicamente para o diagnóstico do TDAH (Thome et al. 2012; Faraone et al. 2014), que é essencialmente clínico e baseado nos critérios sintomatológicos descritos acima.

### *1.2.1. Neuroquímica do TDAH*

Os sistemas de neurotransmissão monoaminérgicos, principalmente o dopaminérgico e o noradrenérgico, são implicados na fisiopatologia do TDAH e no mecanismo de ação de medicamentos utilizados para o seu tratamento (Arnsten and Pliszka 2011; del Campo et al. 2011). A ligação desses neurotransmissores aos seus receptores desencadeia diversas alterações fisiológicas envolvidas na modulação da atenção, estado de alerta e vigilância, plasticidade sináptica, memória e aprendizado, locomoção e outras funções cognitivas e executivas normalmente prejudicadas no TDAH (Biederman and Spencer 1999; Prince 2008; Sarinana et al. 2014; Shinohara et al. 2018).

A dopamina (DA) e a noradrenalina (NE) modulam suas funções por um mecanismo com padrão de ‘U invertido’, ou seja, tanto a atividade muito intensa (por exemplo, durante situações de estresse) quanto muito baixa (por exemplo, estado de sono) prejudica o seu funcionamento (Vijayraghavan et al. 2007; Arnsten 2007). As interações entre os sistemas dopaminérgico e noradrenérgico, bem como a regulação orquestrada entre essas vias, é essencial para uma modulação adequada das funções desempenhadas pelo CPF, como memória de trabalho e atenção (revisado em Xing et al. 2016). Na verdade, a DA e a NE compartilham diversas características bioquímicas, e muitas vezes interagem não só com seus respectivos transportadores e receptores, mas também de forma não canônica com os componentes do outro sistema (Sánchez-Soto et al. 2016). Por exemplo, a DA é recaptada pelo transportador de DA (DAT), mas também pelo transportador de noradrenalina (NET) em condições patológicas e/ou regiões cerebrais com

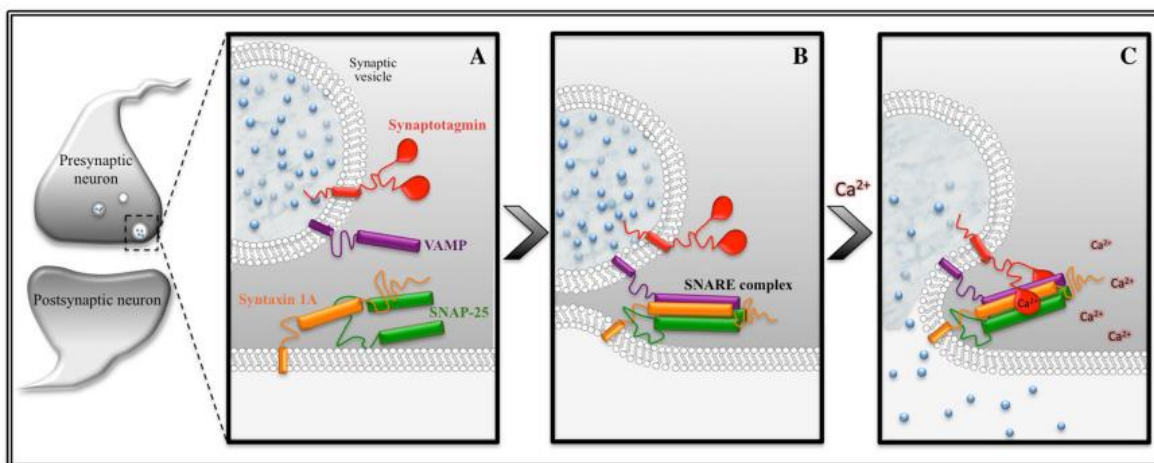
baixa disponibilidade de DAT, como é o caso do CPF (Morón et al. 2002; Arai et al. 2008). Além disso, a transmissão noradrenérgica precisa estar funcionando adequadamente para que a DA seja liberada (Ventura et al. 2005). Nesse sentido, a ausência de neurônios dopaminérgicos na área ventral tegmental induz o aumento da atividade dos neurônios noradrenérgicos no *locus ceruleus*, e vice-versa (Guiard et al. 2008).

No entanto, o TDAH envolve uma neurobiologia complexa que parece ser consequência da interação entre vários sistemas neurofisiológicos disfuncionais. Por exemplo, alterações nos sistemas serotoninérgico, glutamatérgico e GABAérgico também já foram demonstradas no transtorno (Moore et al. 2006; Edden et al. 2012; Bollmann et al. 2015; Bauer et al. 2016; Hou et al. 2018; Wang et al. 2018a). A interação entre esses sistemas também parece ser importante para a fisiopatologia do TDAH, por exemplo, a alteração das funções dopaminérgicas desencadeia a modulação inadequada de vias não dopaminérgicas, principalmente a glutamatérgica e GABAérgica, o que levaria à falhas na inibição de respostas e impulsividade (Sagvolden et al. 2005; Silveri et al. 2013). Informações adicionais sobre a neuroquímica implicada no TDAH podem ser encontradas no capítulo IX - item 9.1.5.

### *1.2.2. Exocitose de neurotransmissores e o TDAH*

Os processos de transmissão de vários neurotransmissores, bem como suas interações, são implicados nas diferentes dimensões da sintomatologia do TDAH. Para que a comunicação entre neurônios ocorra, os neurotransmissores sintetizados no citoplasma e armazenados dentro de vesículas nos neurônios pré-sinápticos são liberados na fenda sináptica em resposta à despolarização, onde irão ativar seus respectivos receptores nos neurônios pós-sinápticos. Esse processo normalmente ocorre de forma rápida e a cessação de uma transmissão sináptica ocorre através de diferentes mecanismos, incluindo a recaptação dos neurotransmissores pelos seus respectivos transportadores, degradação química por enzimas metabolizadoras e ligação aos receptores-alvo (revisado em Kavalali 2015). A regulação de todas essas etapas envolve diversas proteínas, que podem ser específicas para um determinado neurotransmissor ou em comum para mais de um sistema, de forma que a alteração em qualquer um desses componentes pode prejudicar o balanço da transmissão sináptica e causar alterações no funcionamento do cérebro.

Ao passo que cada sistema usualmente possui transportadores, vesículas de armazenamento e receptores específicos, todos eles dependem do processo de liberação (exocitose) de neurotransmissores que envolve um conjunto comum de proteínas. Assim, a modulação desses mecanismos de exocitose poderia explicar os achados implicando várias vias de neurotransmissores no TDAH. Essa liberação envolve um mecanismo geral de fusão de membranas e é controlada por componentes que apresentam homólogos na maioria das membranas celulares, abrangendo um conjunto comum de famílias de proteínas e seus diferentes membros. Mais especificamente, proteínas que compõem o complexo SNARE (*N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) são responsáveis pelo processo de exocitose. O complexo SNARE é constituído por membros das famílias do SNAP-25 (*Synaptosomal-associated protein 25*), da VAMP (*Vesicle-associated membrane protein*) e da STX (Syntaxin), as quais interagem criando um agrupamento de quatro hélices que aproxima as membranas das vesículas às plasmáticas para posterior fusão (**Figura 1**). Outras famílias de proteínas com função regulatória interagem com esse complexo, como a STXBP (Syntaxin-binding protein), CPLX (Complexin), SYP (*Synaptophysin*), SYT (*Synaptotagmin*) e pequenas GTPases da família Rab3 (Südhof 2013; Rizo 2018).



**Figura 1. Formação do complexo SNARE no neurônio pré-sináptico para a liberação de neurotransmissores.** **A.** Os componentes centrais do complexo SNARE (SNAP-25, VAMP-1 ou VAMP-2 e STX1A) e a proteína regulatória SYT1 são mostrados individualmente. **B.** Montagem do complexo SNARE através da ligação de seus membros centrais formando um agrupamento de quatro hélices que aproxima as membranas das vesículas às plasmáticas para posterior fusão. **C.** Após o influxo de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) e sua ligação à SYT1 ocorre a fusão das membranas vesicular e plasmática com consequente liberação dos neurotransmissores. A figura e a versão original da legenda podem ser encontradas em Cupertino et al. (2016).

A atividade do complexo SNARE e consequente liberação de neurotransmissores depende do influxo de cálcio e sua ligação com a SYT1 (Xu et al. 2009). Resultados obtidos a partir de estudos com os ratos espontaneamente hipertensos (SHR), que é um dos modelos animais mais aceitos para o TDAH, indicam que sistemas envolvendo sinalização de cálcio encontram-se alterados nos SHR em comparação ao seu controle Wistar-Kyoto (WKY) (Horn et al. 1995; Lehigh et al. 2001; Lehigh et al. 2004). Em concordância com esses achados, os SHR também apresentam menor *turnover* de DA (que reflete a liberação e metabolismo) na substância negra, área ventral tegmental, estriado e CPF (Linthorst et al. 1994; de Villiers et al. 1995). Isso reflete maior recaptção e reutilização de DA (em concordância com os altos níveis de DAT encontrados em SHR) e assim, metabolismo reduzido ou ainda, menor liberação de DA com prejuízo na sua transmissão nesse modelo.

Outras evidências de que proteínas envolvidas na liberação de neurotransmissores são essenciais para o adequado funcionamento das funções cerebrais são provenientes de estudos sugerindo que os níveis de SNAP-25 e SYT1 no fluido cerebrospinal podem ser úteis como biomarcadores precoces para o declínio cognitivo da doença de Alzheimer (Brinkmalm et al. 2014; Öhrfelt et al. 2016). Os níveis de SNAP-25 e SYT1 foram significativamente maiores em pacientes com prejuízo cognitivo moderado ou com demência devido ao Alzheimer quando comparados a controles (Brinkmalm et al. 2014; Öhrfelt et al. 2016), sugerindo que essas medidas podem auxiliar no monitoramento da degradação sináptica e consequente prejuízo cognitivo.

### **1.3. Fatores etiológicos ambientais para o TDAH**

Apesar de o TDAH apresentar um forte componente genético, inúmeras variáveis ambientais também têm sido propostas como fatores de risco para a predisposição a esse transtorno (Froehlich et al. 2011). Dentre eles, destacam-se baixo peso ao nascer, prematuridade (Franz et al. 2018) e exposição materna a fatores adversos ou substâncias na gestação (Liew et al. 2014; Eilertsen et al. 2017; Zhang et al. 2018; Sandtorv et al. 2018). No entanto, as associações ambientais observadas não possuem relação direta de causa e efeito, pois existem outros fatores não mensurados nesses estudos que podem estar confundindo esses resultados. Fatores ambientais e biológicos agem de forma conjunta na etiologia do TDAH (Faraone and Biederman 2002). Mais detalhes sobre fatores etiológicos ambientais estão descritos no capítulo IX - item 9.1.5.

#### **1.4. Fatores etiológicos genéticos para o TDAH**

A influência genética na susceptibilidade ao TDAH passou a ser mais amplamente explorada a partir de achados clínicos demonstrando que os sintomas de hiperatividade tendiam a agregar-se em famílias (Morrison and Stewart 1971; Cantwell 1972). Desde então, estudos com famílias demonstraram que pais ou irmãos de pacientes com TDAH apresentam um risco de 5 a 10 vezes maior de desenvolver o transtorno quando comparados a controles (Biederman et al. 1990; Biederman et al. 1992). Além disso, filhos de adultos com TDAH também apresentam risco aumentado para o transtorno (Biederman et al. 1995). Os estudos com gêmeos apontam que a susceptibilidade ao TDAH apresenta um forte componente genético, estimando uma herdabilidade de aproximadamente 80% (Faraone et al. 2005; Chang et al. 2013; Larsson et al. 2014). Outras considerações sobre a herdabilidade são apresentadas no capítulo IX - item 9.1.5.

Devido a essa forte influência genética, há grande interesse em identificar regiões cromossômicas e genes que possam estar envolvidos com a fisiopatologia desse transtorno. Considerando que se trata de um fenótipo complexo, essa investigação baseia-se principalmente em explorar variantes genéticas comuns. Nesse sentido, as principais abordagens utilizadas são os estudos de ligação, os estudos de associação de gene candidato e GWAS (Faraone and Larsson 2019).

##### *1.4.1. Estudos de ligação*

Os estudos de ligação foram os primeiros a utilizarem métodos que envolvem varredura genômica, nesse caso para a identificação de sequências de DNA localizadas em regiões cromossômicas transmitidas com maior frequência do que o esperado (ou seja, ligadas ao fenótipo) para os indivíduos afetados de uma família. Apesar de algumas regiões já terem demonstrado evidência de ligação com o TDAH, os achados individuais não alcançaram nível de significância genômica e não foram replicados consistentemente (Faraone and Mick 2010). Uma região do cromossomo 16 (entre 64 Mb e 83 Mb) foi a única que demonstrou evidência de ligação com significância em nível genômico em uma meta-análise (Zhou et al. 2008). A falta de resultados consistentes para outras regiões indicou ser pouco provável que existissem variantes de grande tamanho de efeito para o TDAH e que, portanto, os estudos de associação seriam mais promissores do que os estudos de ligação para a investigação de genes implicados nesse transtorno.

#### 1.4.2. Estudos de gene candidato

Em comparação com os estudos de ligação, um volume bem maior de estudos de associação do tipo gene candidato foi conduzido para a identificação de fatores genéticos envolvidos na susceptibilidade ao TDAH. Os genes codificadores de proteínas dos sistemas de neurotransmissão dopaminérgico e noradrenérgico têm sido extensamente investigados como candidatos, principalmente devido ao envolvimento dessas vias como alvo dos medicamentos usados no tratamento do TDAH.

A meta-análise conduzida por Gizer et al. (2009) sustenta associações significativas para 8 variantes nos genes *DRD4* (*dopamine receptor D4*), *DRD5* (*dopamine receptor D5*), *SLC6A3* ou *DAT1*, *SLC6A4* ou *5-HTT* (*serotonin transporter*), *HTR1B* (*5-hydroxytryptamine receptor 1B*) e *SNAP25*. No entanto, há heterogeneidade significativa entre os achados dos diferentes estudos (Gizer et al. 2009). Outra meta-análise, que incluiu apenas adultos com TDAH, relatou uma associação para variantes do gene *BAIAP2* (*brain-specific angiogenesis inhibitor 1 - associated protein 2*), envolvido na morfogênese e maturação dos espinhos dendríticos (Bonvicini et al. 2016). Em geral, as associações tanto para crianças como para adultos apresentam um pequeno tamanho de efeito, com *odds ratios* em média menores que 1.5. Além desses, outros genes catecolaminérgicos implicados na susceptibilidade ao TDAH incluem os que codificam o transportador *SLC6A2* ou *NET* e *ADRA2A* (*adrenoceptor alpha 2A*), e as enzimas *DBH* (*Dopamina-beta-hidroxilase*), *MAOA* (*monoamine oxidase A*) e *COMT* (*catechol-o-methyltransferase*) (revisado em Faraone and Mick 2010).

Como mencionado anteriormente, a exocitose de neurotransmissores é um mecanismo especialmente abrangente e que tem o potencial de mediar a função de todos os sistemas de neurotransmissão implicados no TDAH, e portanto, é promissor como mecanismo candidato. O sistema inclui vários genes já estudados no TDAH, como *SNAP25*, *SYT1* e *SYT2*, *VAMP1* e *VAMP2*, *STX1A* e *SYN1* (*Synapsin I*), mas eles ainda não apresentam dados suficientes para inclusão em meta-análises (Sánchez-Mora et al. 2013; Bonvicini et al. 2016; Cupertino et al. 2016; Cupertino et al. 2017). Na amostra brasileira utilizada nessa Tese, já foram observados resultados especialmente promissores envolvendo o gene *SYT1* e o TDAH, bem como outros fenótipos externalizantes (Cupertino et al. 2016; ver capítulo IX - item 9.1.2).

### 1.4.3. Estudos de associação por varredura genômica

Os GWAS constituem um método de análise em larga-escala que é considerado o mais promissor para revelar possíveis regiões do genoma envolvidas na susceptibilidade a fenótipos multifatoriais, incluindo o TDAH (Neale et al. 2010c). Há alguns anos foi desenvolvido um painel de SNPs em microarranjo de DNA para estudos genéticos de associação em larga escala de fenótipos psiquiátricos, conhecido como *Psych Chip* (*Infinium PsychArray BeadChip*; Illumina), através do qual a nossa amostra e outras provenientes de grupos participantes de diversos consórcios foram genotipadas. Este microarranjo de DNA possui ampla cobertura genômica, além de ter conteúdo especificamente voltado para estudos relacionados a transtornos psiquiátricos, ampliando assim, a probabilidade de identificar variantes genéticas associadas a estes fenótipos. Em geral, os GWAS têm se mostrado de grande importância pela possibilidade de apontar novos genes/*loci* candidatos. No entanto, a principal limitação dessa abordagem é que requer grandes tamanhos amostrais para a identificação de associações significativas, e assim as primeiras tentativas de GWAS para o TDAH obtiveram sucesso aquém do esperado (Lasky-Su et al. 2008b; Lasky-Su et al. 2008a; Neale et al. 2008; Mick et al. 2010; Neale et al. 2010a; Neale et al. 2010b; Hinney et al. 2011; Fliers et al. 2012; Stergiakouli et al. 2012; Ebejer et al. 2013; Yang et al. 2013).

O primeiro estudo relatando sinais de associação em nível genômico (valor de  $P < 5 \times 10^{-8}$ ) para o TDAH foi uma meta-análise de GWAS que contou com amostras de 20.183 casos e 35.191 controles provenientes do iPSYCH (do inglês, *Lundbeck Foundation Initiative for Integrative Psychiatric Research*) e PGC (do inglês, *Psychiatric Genomics Consortium*), em que foram encontradas associações para 12 *loci* independentes (Demontis et al. 2019). Dentre elas, destaca-se o gene *FOXP2* (*forkhead box p2*), o qual foi previamente implicado no TDAH em adultos (Ribasés et al. 2012) e em transtornos de linguagem (Lai et al. 2003). Outros genes associados também apresentam relevância biológica, como o *DUSP6* (*dual specificity phosphatase 6*) que regula a homeostase de neurotransmissores através da modulação dos níveis de DA das sinapses. Em outra meta-análise de GWAS recentemente publicada, que incluiu nove amostras de adultos com TDAH provenientes do consórcio SAGA (do inglês, *Study of ADHD trait genetics in adults*), o SNP mais fortemente associado foi o rs12661753 no gene *STXBP5-AS1* ( $P = 3.02 \times 10^{-7}$ ), que codifica um RNA longo não codificante (Arias-Vásquez et al. 2019). Esse

SNP também apresentou associação nominal ( $P = 3.07 \times 10^{-2}$ ) na amostra de crianças com TDAH do consórcio EAGLE (do inglês, *Early Genetics and Lifecourse Epidemiology*) (Middeldorp et al. 2016). Já na meta-análise incluindo ambas as amostras do SAGA e EAGLE, o SNP mais associado foi o rs12664716 ( $P = 2.05 \times 10^{-7}$ ) que também está localizado no gene *STXBP5-AS1* e apresenta alto desequilíbrio de ligação com o rs12661753 (Arias-Vásquez et al. 2019). No entanto, a variante *index* rs12661753 não foi associada com a susceptibilidade ao TDAH no estudo que incluiu as amostras do iPSYCH + PGC ( $P = 0.6316$ ). Os autores também avaliaram a funcionalidade desse gene e demonstraram que ele é capaz de modular a expressão do *STXBP5*, gene envolvido na formação do complexo SNARE.

Diante desse cenário, destaca-se o importante papel do desenvolvimento de consórcios internacionais entre grupos de pesquisa para aumentar o tamanho amostral, e assim ampliar a identificação de novos *loci* associados ao transtorno, bem como confirmar associações em amostras de replicação independentes. Além disso, abordagens que utilizam dados de varredura genômica, mas contam com técnicas estatísticas que aumentam o poder estatístico para detecção de associações, tais como a análise combinada de variantes em genes relacionados a uma mesma via ou *gene-sets*, também constituem ferramentas promissoras para o entendimento dos mecanismos envolvidos na neurobiologia do TDAH (de Leeuw et al. 2015). Utilizando essa análise de enriquecimento de vias de genes, por exemplo, Mooney et al. (2016) apontaram para vias envolvendo a regulação da liberação de neurotransmissores, crescimento dos neuritos e orientação axonal como fatores importantes a serem considerados na etiologia do TDAH (Mooney et al. 2016).

### **1.5. Alterações proteômicas no TDAH**

Sabe-se que as proteínas desenvolvem um importante papel funcional na fisiopatologia de transtornos psiquiátricos, em que modificações de estrutura, de expressão, de interações, entre outras, são capazes de alterar a funcionalidade dos sistemas biológicos (Sokolowska et al. 2015). Considerando que os padrões de expressão gênica não se correlacionam completamente com os padrões de expressão proteica, técnicas de proteômica complementam a transcriptômica e oferecem uma inferência mais próxima dos processos biológicos envolvidos na fisiopatologia de transtornos psiquiátricos, permitindo



a identificação de modificações em nível proteico. Dessa forma, cresce a utilização dessa técnica na psiquiatria com o objetivo de buscar biomarcadores que possam ser úteis para o diagnóstico, prognóstico e desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para o tratamento dessas doenças.

A pesquisa de biomarcadores proteômicos pode ser feita em tecidos *post-mortem* ou fluidos biológicos de humanos, bem como em modelos animais *ex vivo*, comparando os resultados entre casos e controles, ou, ainda, comparando grupos que receberam tratamento farmacológico com um grupo não tratado (Thome et al. 2012). A análise proteômica refere-se ao estudo do conjunto de proteínas expressas no tecido/fluido de interesse, sem a definição *a priori* de proteínas candidatas, sendo, portanto, um processo gerador de hipóteses. De maneira geral, as etapas de uma análise proteômica envolvem: (1) isolamento de proteínas de um determinado tecido ou fluido biológico em condições diferentes (como em uma condição patológica versus normal; ou ainda sob efeito de alguma intervenção farmacológica ou ambiental); (2) fracionamento e separação de um complexo conjunto de proteínas; (3) análise das frações separadas por espectrometria de massa e (4) uso de ferramentas de bioinformática e bancos de dados específicos para o processamento de dados.

Maiya et al. (2007) empregaram essa abordagem utilizando cérebro de ratos DBA2/J (muito usados em estudos de comportamentos relacionados à função dopaminérgica) em busca de proteínas que interagem com o DAT, que é o alvo terapêutico dos psicoestimulantes (principais medicamentos utilizados para o tratamento do TDAH), e encontraram interações com 20 proteínas de diferentes funções, como de transporte, do citoesqueleto, associadas à matriz extracelular e canais iônicos. Dentre elas, destaca-se as interações com o canal de potássio do tipo Kv2.1 e Syn1, envolvidos na regulação na liberação de neurotransmissores (Maiya et al. 2007). Outro estudo, avaliando o CPF, estriado e mesencéfalo de ratos Wig (um possível modelo animal para o TDAH), demonstrou diferença de expressão de 19 proteínas em relação aos controles, dentre elas 5 envolvidas na liberação de neurotransmissores e o restante em processos mais gerais, como os de metabolismo, transporte, síntese proteica e citoesqueleto (Hirano et al. 2008). Vale destacar, no entanto, que não há estudos avaliando alterações proteômicas induzidas pela administração do psicoestimulante metilfenidato no tratamento do TDAH, tema alvo dessa Tese.

Por outro lado, a proteômica tem sido amplamente utilizada para avaliar os efeitos de drogas de abuso em vias bioquímicas e redes de proteínas. Uma revisão que reúne resultados de estudos sobre o perfil de expressão proteica após o uso de diversas drogas de abuso aponta principalmente para o envolvimento da transmissão sináptica e vias de sinalização de funções neuronais em resposta a essas substâncias (Wang et al. 2011). A avaliação do perfil proteico sináptico no núcleo *accumbens* de ratos após a exposição ao psicoestimulante metanfetamina revelou alterações em proteínas envolvidas com estresse celular, plasticidade sináptica e neuroadaptação (Bosch et al. 2015). Esses resultados, além de confirmarem o envolvimento de proteínas previamente relacionadas à dependência de substâncias, também foi capaz de identificar outras proteínas para as quais ainda não existiam evidências de descritas na literatura.

Além da avaliação de mudanças na expressão proteica após a administração de fármacos de uso terapêutico ou de abuso, também é comum a utilização da proteômica para a investigação de efeitos de fatores ambientais. Por exemplo, Womersley et al. (2015) observaram que, após a separação materna, proteínas envolvidas com morfologia neuronal, sinalização, metabolismo e energia apresentaram-se diferencialmente expressas em ratos da linhagem SHR (como mencionado anteriormente, o modelo animal mais utilizado para o TDAH), quando comparadas às linhagens controle WKY e Sprague Dawley. Esses resultados sugerem que as diferenças encontradas estão relacionadas principalmente ao fenótipo apresentado pelos ratos SHR e reforçam a importância de interações gene-ambiente na modulação do desfecho comportamental.

De maneira geral, os estudos que existem até o momento utilizando a abordagem proteômica no TDAH são preliminares e necessitam replicação. Para doenças com causa biológica mais clara, como o câncer, ou até mesmo algumas doenças neurodegenerativas como o Alzheimer e Parkinson, a utilização dessa técnica para a identificação de biomarcadores tem alcançado um sucesso maior do que para transtornos psiquiátricos (Alawam 2014). Ainda assim, esse tipo de abordagem é extremamente promissor para a compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos na etiologia de doenças complexas como o TDAH, na resposta terapêutica a diferentes medicamentos utilizados no tratamento desses transtornos, bem como para a identificação de novos alvos terapêuticos.

## 1.6. Tratamento do TDAH

O grande prejuízo individual e social decorrentes da sintomatologia do TDAH gera a demanda por tratamento, que pode ser farmacológico, não farmacológico ou a combinação de ambos. O tratamento não farmacológico compreende treinamentos psicossociais e comportamentais que estimulam funções neuropsicológicas específicas normalmente associadas ao TDAH, como as cognitivas e executivas. No entanto, uma recente meta-análise realizada em amostras de crianças e adolescentes não apresenta evidências de que a aplicação individual de treinamentos de atenção e de memória de trabalho e *neurofeedback* tenha um efeito significativo na redução da sintomatologia central do TDAH (Catalá-López et al. 2017). Por outro lado, o treinamento comportamental, principalmente feito pelos pais com participação ativa da criança e dos professores, demonstrou ser superior ao placebo, porém inferior ao uso de estimulantes (Catalá-López et al. 2017). Em adultos, apesar de efeitos benéficos terem sido demonstrados para algumas intervenções não-farmacológicas, como *mindfulness* (Cairncross and Miller 2016) e a terapia cognitiva comportamental (Jensen et al. 2016; Dittner et al. 2018), mais evidências são necessárias para esclarecer o valor terapêutico desse tipo de tratamento.

De acordo com vários guias terapêuticos, incluindo o *British Association of Psychopharmacology* e *National Institute for Health and Care Excellence* (Bolea-Alamañac et al. 2014; NICE guideline 2018), os psicoestimulantes, como lisdexamfetamina e MPH, são considerados o tratamento farmacológico de primeira escolha para o TDAH. Para os pacientes que não toleram ou não respondem a esses medicamentos, a atomoxetina é o fármaco de segunda escolha, seguida por outros medicamentos não estimulantes, incluindo agentes adrenérgicos e antidepressivos (Kooij et al. 2010).

### 1.6.1 Considerações sobre o tratamento em adultos

A trajetória dos sintomas de TDAH desde a infância até a vida adulta ainda não é completamente compreendida, e as taxas de persistência são bastante variáveis entre os estudos (Biederman et al. 2010; Karam et al. 2015). Fatores como gravidade dos sintomas, tratamento farmacológico e comorbidades psiquiátricas têm se apresentado como importantes preditores da persistência do TDAH na vida adulta (Karam et al. 2015; Caye et

al. 2016). Sugere-se que o aumento da idade possa estar associado ao declínio dos sintomas (Biederman et al. 2000; Faraone et al. 2006). Essa mudança na apresentação clínica ocorre em todas as dimensões sintomatológicas, com maior intensidade de declínio para a hiperatividade (70%), seguido pela impulsividade (50%) e pela desatenção (40%) (Biederman et al. 2000). Essa mudança nas dimensões sintomatológicas entre a infância e a vida adulta também impacta a estratégia de tratamento. Além disso, o fato de não haver uma completa sobreposição de fatores genéticos associados com o TDAH e seu tratamento em crianças e adultos pode sugerir que diferentes mecanismos estejam envolvidos nesses grupos. Isso também pode ser consequência das diferenças nas dimensões sintomatológicas mais importantes de acordo com a idade.

Conforme mencionado anteriormente, adultos e crianças apresentam diferentes perfis de comorbidades, e isso também influencia a abordagem a ser utilizada para o tratamento. As comorbidades devem ser consideradas e avaliadas em cada caso para definir as alternativas terapêuticas tanto para o TDAH quanto para a comorbidade. Ver alguns exemplos de estratégias terapêuticas no capítulo IX - item 9.1.5.

Outro aspecto importante do tratamento de adultos com TDAH refere-se à aderência e persistência ao tratamento. Nesse sentido, fatores que já foram associados a não aderência e/ou à descontinuidade do tratamento incluem ser do sexo masculino, níveis educacionais baixos, falta de percepção de eficácia, e a presença de comorbidades como os transtornos bipolar, obsessivo compulsivo, opositor desafiante, abuso de álcool, fobia social, entre outros (Victor et al. 2009; Sobanski et al. 2014).

Todas essas questões prejudicam o andamento de projetos envolvendo desenhos experimentais que incluam a coleta de informações sobre o tratamento, pois requerem a homogeneidade da proposta de tratamento e seguimento desses pacientes. Essas são as principais razões para os pequenos tamanhos amostrais encontrados entre os grupos de pesquisa, e para a heterogeneidade na caracterização fenotípica das amostras, o que limita o desenvolvimento de estudos com maior potencial para identificação de fatores envolvidos na resposta ao tratamento.

#### *1.6.2. Metilfenidato (MPH) – principal estimulante utilizado no tratamento do TDAH*

O MPH foi inicialmente sintetizado em 1944 por Leandro Panizzon e comercializado em 1954 pela *Ciba-Geigy Pharmaceutical Company*. O nome comercial

derivou do nome da esposa de Panizzon, Marguerite ou “Rita”, que usava o fármaco durante seus jogos de tênis. No entanto, levou algum tempo até ele que fosse utilizado para o tratamento da hiperatividade em crianças. As primeiras indicações para a utilização desse medicamento incluíam fadiga crônica, estados depressivos, letargia e narcolepsia. Com o aumento do interesse no reconhecimento do diagnóstico do TDAH, o uso do MPH para esse fim também cresceu, e as indicações atualmente aprovadas pelo *Food and Drug Administration*, órgão regulatório de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos, incluem TDAH e narcolepsia (revisado em Morton and Stockton 2000; Lange et al. 2010; Wenthur 2016).

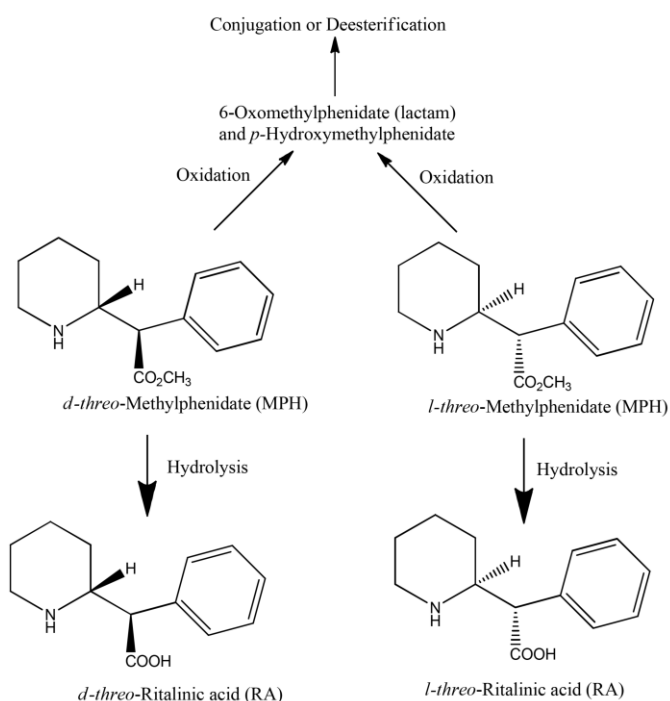
Atualmente, o MPH é o psicoestimulante mais amplamente utilizado mundialmente, e estudos de meta-análise confirmam sua segurança e eficácia na redução dos sintomas de TDAH tanto em crianças e adolescentes (Catalá-López et al. 2017; Cortese et al. 2018) quanto em adultos (Castells et al. 2011; De Crescenzo et al. 2017; Cortese et al. 2018). O MPH também produz efeitos benéficos sobre algumas funções executivas frequentemente prejudicadas em indivíduos com TDAH, como o controle inibitório, memória de trabalho e atenção sustentada, e essa associação independe da idade (Tamminga et al. 2016). Apesar de sua eficácia comprovada no alívio dos sintomas em indivíduos com TDAH, uma proporção considerável dos pacientes não apresenta resposta sintomatológica adequada e/ou interrompe o tratamento precocemente (Spencer et al. 1996; Gajria et al. 2014). As principais razões relatadas para a interrupção do tratamento são efeitos colaterais, ineficácia e/ou resposta desfavorável (Gajria et al. 2014). Os efeitos colaterais mais comuns incluem irritabilidade, insônia, perda de apetite, agitação e ansiedade. O sistema de liberação da forma farmacêutica também influencia a aderência ao tratamento com MPH. As formulações de liberação prolongada (Concerta® e Ritalina LA®) proporcionam melhor aderência do que as de liberação imediata (Ritalina®), pois a frequência da administração de cada dose apresenta um intervalo mais longo.

#### ***1.6.2.1. Farmacocinética do MPH***

Na maioria das formulações disponíveis, o MPH é administrado como uma mistura racêmica dos enantiômeros d-MPH e l-MPH (**Figura 2**), sendo a primeira a forma farmacologicamente ativa do composto (Markowitz and Patrick 2008). A absorção após administração oral de MPH é rápida e quase completa, com os picos de concentração

plasmática sendo alcançados entre 1.5 e 2.5 horas para a formulação de liberação imediata (Barkley 2018). A Ritalina LA® produz perfil bimodal na curva de tempo-concentração no plasma, apresentando dois picos separados por aproximadamente 4 horas, enquanto que o Concerta® atinge o pico inicial de concentração plasmática entre 1 e 2 horas, mas continua a aumentar nas horas subsequentes, com concentração plasmática máxima sendo atingida em cerca de 6 a 8 horas (Modi et al. 2000). O MPH sofre extenso metabolismo de primeira passagem, e por isso sua biodisponibilidade absoluta é em torno de 23% e 5% para o d- e l-enantiômero, respectivamente (Srinivas et al. 1993).

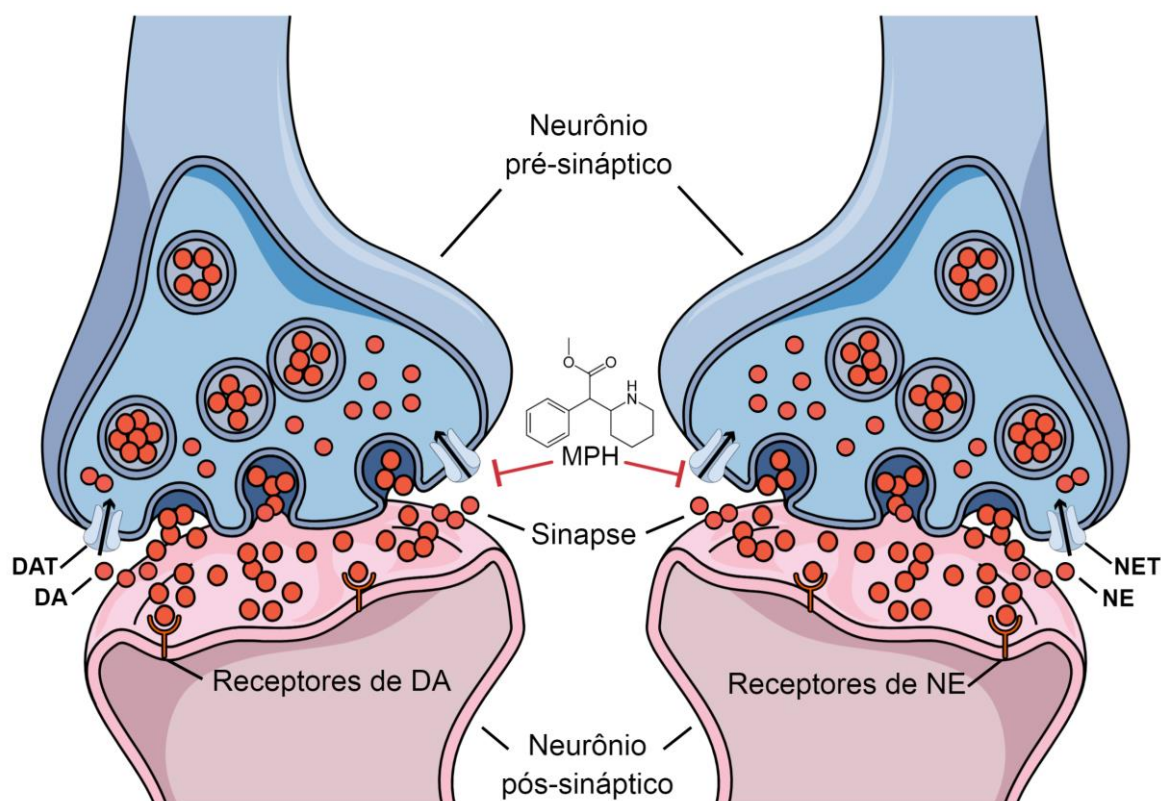
Ao alcançar a circulação sanguínea, o MPH é distribuído entre o plasma e eritrócitos e a ligação a proteínas é baixa. A metabolização do MPH é realizada majoritariamente por hidrólise pela enzima hepática carboxilesterase CES (1A1), formando o seu principal metabólito, o ácido alfa-fenil-2-piperidino acético ou ácido ritalínico (**Figura 2**), que é farmacologicamente inativo (Faraj et al. 1974). O tempo de meia vida de eliminação varia entre 3 a 4 horas para todas as formulações (Modi et al. 2000). A maior parte da dose total administrada é excretada pela urina e uma proporção pequena pelas fezes sob a forma de metabólitos entre 48 a 96 horas. Somente pequenas quantidades (<1%) de MPH inalterado são encontradas na urina (Faraj et al. 1974).



**Figura 2. Vias metabólicas do metilfenidato em humanos.** A figura original e extensa caracterização farmacocinética do MPH podem ser encontradas em Yang et al. 2014.

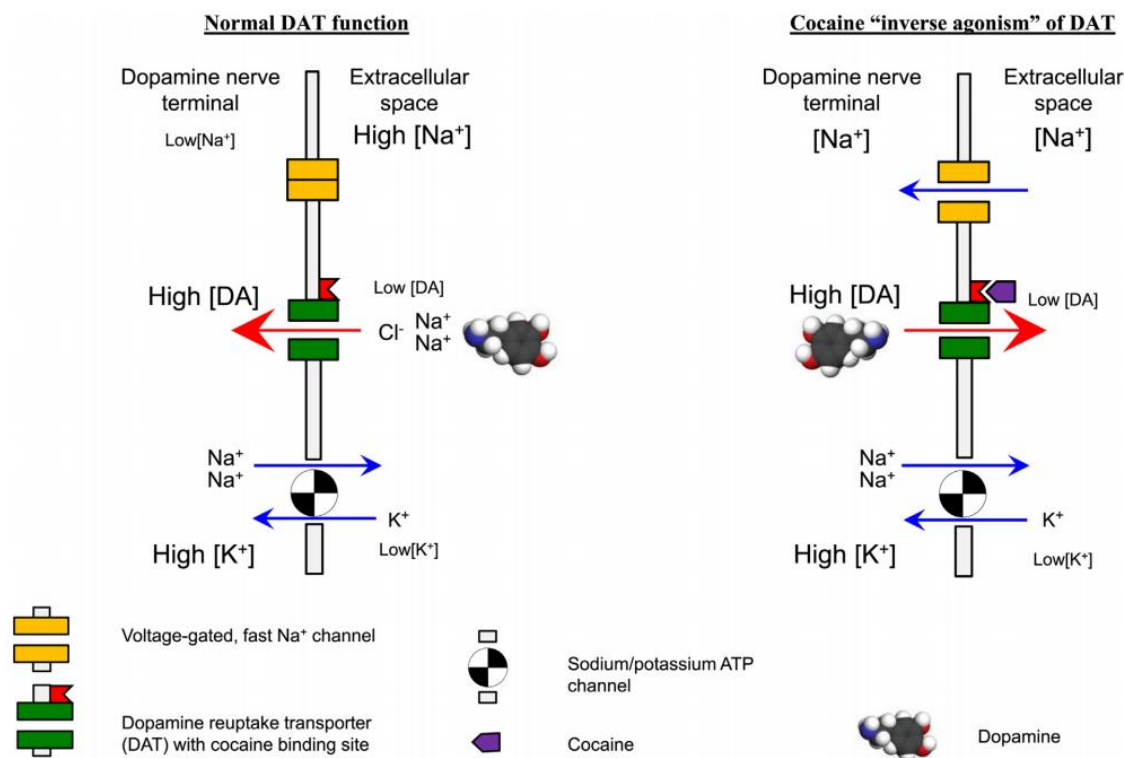
### 1.6.2.2. Mecanismo de ação do MPH

O mecanismo de ação central proposto inicialmente para o MPH indicava apenas o bloqueio do DAT para as ações desse medicamento. Esse processo inibe a recaptação de DA para os neurônios pré-sinápticos e leva a maior disponibilidade desse neurotransmissor na fenda sináptica. Acreditava-se que essa amplificação apenas da atividade dopaminérgica seria suficiente para resultar na melhora do déficit de atenção, funcionamento cognitivo e hiperatividade motora (Wilens 2008). Posteriormente, observou-se que o MPH é capaz de bloquear não só o DAT, mas também o NET e com uma intensidade ainda maior: em doses terapêuticas um bloqueio de 70-80% foi observado para os NETs, enquanto que para os DATs essa ocupação é de 60-70% (Hannestad et al. 2010). Atualmente, o bloqueio de ambos os transportadores observados em diversos estudos de neuroimagem é a hipótese mais aceita para explicar os efeitos farmacológicos do medicamento (Zimmer 2017), conforme ilustrado na **Figura 3**.



**Figura 3. Mecanismo de ação do metilfenidato.** Inibição da recaptação de dopamina (DA) e noradrenalina (NE) a partir do espaço extracelular para o neurônio pré-sináptico através do bloqueio dos transportadores de DA e NE (DAT e NET, respectivamente). Esse processo leva ao aumento da concentração desses neurotransmissores na fenda sináptica, amplificando a neurotransmissão. Figura criada na plataforma *Mind the Graph*.

No entanto, mecanismos adicionais parecem estar envolvidos nas ações do MPH, e uma hipótese alternativa baseada em evidências de estudos experimentais foi postulada por Heal et al., 2014. Através de uma revisão sobre os inibidores da recaptação de DA, os autores concluem que o MPH, bem como a cocaína, apresentam perfil neuroquímico e propriedades discriminativas muito distintos de outros medicamentos pertencentes à mesma classe. Os autores não questionam a hipótese comumente aceita, mas sugerem que os efeitos de ambos os psicoestimulantes envolvem principalmente a liberação dependente de voltagem de DA e outras monoaminas, através de um mecanismo de “agonismo inverso” do DAT (**Figura 4**; Heal et al. 2014).



**Figura 4. Mecanismo de ação alternativo proposto para metilfenidato, cocaína e compostos relacionados.** À esquerda: função normal do transportador de dopamina (DAT), que é responsável pela recaptação da dopamina (DA) da fenda sináptica para dentro do neurônio pré-sináptico. À direita: esquematização do mecanismo farmacológico proposto de agonismo inverso, em que a ligação desses agentes ao DAT levaria a mudanças conformacionais que resultariam na abertura temporária do canal do transportador. Esse processo facilitaria o transporte reverso de DA do neurônio pré-sináptico para a fenda sináptica. A figura e a versão original da legenda podem ser encontrada em Heal et al. (2014).



### ***1.6.2.3. Evidências adicionais relacionadas às ações do MPH***

Ainda que o mecanismo de ação do MPH venha sendo extensivamente estudado, suas ações no nível celular ainda são pouco compreendidas. Estudos experimentais têm sido desenvolvidos na tentativa de esclarecer os mecanismos existentes por trás de seus efeitos farmacológicos. Em nível pré-sináptico, o MPH demonstrou induzir uma redistribuição do VMAT-2, produzindo uma alteração da transmissão dopaminérgica por um mecanismo independente de DAT. Essas modificações envolveram o aumento da velocidade do transporte de DA para dentro dessas vesículas, com consequente aumento do seu conteúdo e da velocidade de liberação (Volz et al. 2007; Riddle et al. 2007; Volz et al. 2008). O VMAT-2 é essencial para a captação de DA do citoplasma para o interior de vesículas sinápticas, as quais serão armazenadas para posterior liberação. Dessa forma, as proteínas associadas a essas vesículas constituem importantes reguladores tanto para o fluxo de DA dentro dos neurônios, como para a liberação de DA mediada por vesículas. Além disso, considerando que elas foram manipuladas farmacologicamente, nesse caso por MPH, elas podem representar um alvo para o tratamento de transtornos que envolvem transmissão dopaminérgica alterada, como o TDAH.

Por outro lado, outro estudo não encontrou diferenças nos níveis de VMAT-2 com o tratamento crônico com MPH (Simchon et al. 2010). No entanto, esse estudo não avaliou as frações do VMAT-2 (citoplasmática e associada à membrana) separadamente, como nos estudos anteriores e, por tanto, não se pode descartar a possibilidade da ocorrência da redistribuição de VMAT-2. Além disso, o tratamento com MPH foi associado a menores níveis de DAT e menor liberação de DA basal (sem estímulo). Os autores sugerem que é possível que o bloqueio de DAT pelo MPH e o consequente aumento dos níveis de DA na fenda sináptica possa ativar auto-receptores pré-sinápticos inibitórios, diminuindo a liberação basal de DA, e que a baixa densidade de DAT seja um mecanismo compensatório a esse processo (Simchon et al. 2010).

Outra ação demonstrada pelo MPH, avaliada através do potencial pós-sináptico excitatório em cortes de hipocampo de ratos, foi o aumento de ambos os mecanismos de depressão de longa duração (LTD) e potenciação de longa duração (LTP), fatores envolvidos na plasticidade neuronal sináptica e implicados no aprendizado e memória. A ativação de receptores de NE  $\beta$ -adrenérgicos é o mecanismo mais provável sugerido para mediar esse processo, considerando que a administração de um antagonista desses

receptores, o timolol, bloqueou o efeito induzido pelo MPH (Dommett et al. 2008). Estudos posteriores sugerem que o aumento da LTP induzido pelo MPH é mediado não só pela a ativação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, mas também dos receptores pós-sinápticos de DA D1/D5 (Jenson et al. 2015; Rozas et al. 2015). Considerando que a utilização de antagonistas dos receptores D1 e  $\alpha$ -2 adrenérgicos suprime os efeitos farmacológicos do MPH sobre tarefas envolvendo funções cognitivas no CPF (Arnsten and Dudley 2005; Andrews and Lavin 2006; Gamo et al. 2010), a interação do MPH com esses receptores parece explicar a melhora cognitiva resultante do tratamento com esse medicamento. Sugere-se ainda que esse processo envolva o deslocamento e inserção de receptores ionotrópicos de glutamato AMPA funcionais para a membrana plasmática (Rozas et al. 2015), o que é plausível considerando que o MPH também se mostrou capaz de modular as correntes mediadas por receptores glutamatérgicos no CPF (Urban et al. 2013; Cheng et al. 2014).

O CPF parece ser a região mais importante para as ações do MPH em relação à melhora cognitiva. Por exemplo, em comparação com o estriado, em situações de funcionamento normal do DAT, ambas as regiões apresentam níveis elevados de DA (característica essencial para as ações do MPH). No entanto, em modelos de ratos *knockout* para o gene DAT, o MPH induz aumento dos níveis extracelulares de DA apenas no CPF, mas não no estriado (Takamatsu et al. 2015). Esses dados sugerem que mesmo com o funcionamento cerebral alterado pela ausência do DAT e pelo consequente estado hiperdopaminérgico constitutivo desses animais, o CPF, mas não o estriado, mantém um papel fundamental para os efeitos terapêuticos do MPH. Ainda que as ações do MPH no estriado isoladamente não sejam capazes de explicar seus efeitos nas funções cognitivas, o envolvimento conjunto de ambas as regiões parece mediar os efeitos terapêuticos do MPH (Spencer et al. 2015). Há ainda evidências de que baixas doses de MPH aumentam o efluxo de DA e NE no CPF, ao contrário de outras regiões, em que as mesmas doses demonstraram um impacto mínimo no efluxo desses neurotransmissores (Berridge et al. 2006).

As diferenças de doses administradas também geram efeitos bastante distintos para o MPH, em que altas doses estão associadas a um efeito inibitório sobre a transmissão dopaminérgica, de uma maneira similar ao que acontece para a cocaína (Federici et al. 2014). A teoria proposta para explicar essa inibição é a redução do processo inicial da

liberação de DA a partir das vesículas sinápticas, o qual parece ser independente das interações da cocaína e MPH com o DAT e da ativação dos receptores de DA do tipo D2. Essa hipótese vai ao encontro de dados adicionais demonstrando que baixas doses de cocaína ou MPH aumentam a fosforilação de sinapsinas, enquanto que altas doses dessas substâncias diminuem a fosforilação, processo que parece ser necessário para a mobilização das vesículas de DA para as membranas e subsequente liberação na fenda sináptica (Federici et al. 2014).

O conjunto de dados existentes até o momento permite inferir que o aumento das catecolaminas, principalmente no CPF, e subsequente ativação de determinados receptores é o principal mecanismo responsável pelos efeitos terapêuticos observados no tratamento com MPH. Essas ações provavelmente desencadeiam alterações na atividade de outras regiões e redes, como as redes fronto-estriatais que conectam o CPF e o estriado, o que pode contribuir para a ação farmacológica do MPH. No entanto, as ações terapêuticas do MPH sobre os diversos sintomas relacionados ao TDAH ainda precisam ser melhor esclarecidas, considerando que os efeitos em diferentes domínios parecem envolver mecanismos moleculares específicos.

#### ***1.6.2.4. Efeitos do MPH na expressão de genes e proteínas***

Modelos celulares, principalmente linhagens neuronais, têm sido muito úteis na elucidação dos processos decorrentes da exposição ao MPH. Um estudo avaliando níveis de neurotransmissores e expressão gênica voltada para componentes sinápticos em células PC12 (linhagem neuronal derivada de feocromocitoma da medula suprarrenal de rato) encontrou expressão reduzida de *Syt1*, *Syt4*, *Stx1a* e *Net* em células tratadas com baixas concentrações de MPH, enquanto que altas doses não revelaram diferenças significativas (Bartl et al. 2010). É importante destacar que essa investigação foi realizada em células não expressando DAT, pois o objetivo dos autores foi investigar os mecanismos moleculares adicionais do MPH, independentemente do bloqueio do DAT. Esses resultados são intrigantes considerando que esse mesmo estudo, ao avaliar os níveis de neurotransmissores, encontrou níveis extracelulares de NE maiores e de DA menores em células tratadas quando comparadas aos controles, o que contradiz em parte outros estudos demonstrando níveis maiores de ambos os neurotransmissores no meio extracelular (Kuczenski and Segal 2002; Koda et al. 2010; Takamatsu et al. 2015). No entanto, modelos celulares e experimentais devem ser interpretados com cautela, pois não representam

completamente as condições fisiológicas em humanos. Ainda assim, esses dados corroboram a hipótese de um envolvimento da excitotoxicidade nas ações do MPH (Volz et al. 2008; Simchon et al. 2010), considerando que SYT1, SYT4 e STX1A são proteínas que agem em neurônios pré-sinápticos regulando a liberação de neurotransmissores para a fenda sináptica.

O MPH modifica a expressão de vários outros genes/proteínas em diferentes regiões cerebrais de ratos. Entre eles estão alguns fatores de transcrição como o Bdnf (*Brain derived neurotrophic factor*) (Brown et al. 2012), C-fos (*Proto-oncogene c-fos*) e Zif268 ou Egr1 (*Early growth response 1*) (Van Waes et al. 2010). Alterações induzidas por MPH também foram relatadas para componentes envolvidos na plasticidade neuronal e formação dos espinhos dendríticos, como Arc (*Activity regulated cytoskeleton-associated protein*), IRSp53 (*Insulin receptor substrate protein 53*), Cdc42 (*Cell division control protein 42*), Arp2 (*Actin-related protein 2*) e Homer1 (*Homer scaffold protein 1*) com efeitos diferenciais de acordo com as regiões cerebrais (Yano and Steiner 2005; Quansah et al. 2017).

Em humanos, a avaliação de células linfoblastóides derivadas de pacientes adultos com TDAH e controles através da análise de um microarranjo de varredura transcriptômica detectou 138 genes diferencialmente expressos em células tratadas com MPH. Houve diferença de expressão, por exemplo, na *ATXN1* (*Ataxin 1*), *MAP3K8* (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8*), *SLC2A3* ou *GLUT3* (*Glucose transporter type 3*) e *HEY1* (*Hairy and Enhancer of Split-Related Protein1*) no tratamento crônico em controles, além da *ATXN1* (*Ataxin 1*) e *NAV2* (*Neuron navigator 2*) no tratamento agudo em pacientes com TDAH (Schwarz et al. 2015). Os dados desse estudo, demonstrando que não há uma completa sobreposição das associações encontradas no grupo de pacientes com TDAH e no grupo controle, sugerem uma ação diferencial do MPH de acordo com o status diagnóstico.

#### **1.6.2.5. Alterações em regiões cerebrais induzidas por MPH**

Através da avaliação estrutural e funcional do cérebro, os estudos de neuroimagem podem fornecer informações valiosas sobre as modificações induzidas pelo tratamento com MPH. O desenvolvimento das técnicas de neuroimagem, como a tomografia por emissão de pósitrons, foi essencial para elucidar as interações entre o MPH e os seus principais alvos moleculares e identificar a sua afinidade pelos transportadores DAT e NET (Volkow

et al. 2002; Hannestad et al. 2010). No entanto, considerando os vários estudos sugerindo que os efeitos do MPH não são completamente explicados apenas pelo bloqueio desses transportadores (Husson et al. 2004; Gronier 2011), a busca por alterações cerebrais decorrentes do tratamento com MPH é constante, pois pode ajudar na elucidação de efeitos farmacológicos complementares do MPH.

Nesse sentido, meta-análises apoiam um efeito induzido pelo MPH de normalização do volume da massa cinzenta, que se encontra reduzida em pacientes com TDAH, em regiões dos gânglios basais envolvidas com o controle motor, como o putâmen, globo pálido e núcleo caudado (Nakao et al. 2011; Frodl and Skokauskas 2012). Essas alterações foram observadas principalmente em crianças, enquanto que em adultos a região associada foi o córtex cingulado anterior, que está envolvido com o processamento e regulação emocional (Frodl and Skokauskas 2012). No entanto, a alta heterogeneidade entre os estudos deve ser considerada na interpretação desses resultados, como diferenças de gênero, dose, tempo de tratamento, perfil de comorbidades, entre outros. Além disso, a mega-análise mais recente que confirma resultados anteriores demonstrando que os volumes do núcleo *accumbens*, da amígdala, do caudado, do hipocampo, do putâmen e o intracranial encontram-se reduzidos em pacientes com TDAH, não apoia nenhum efeito do tratamento com psicoestimulantes sobre o volume nessas regiões (Hoogman et al. 2017).

Os estudos investigando função cerebral através da técnica de ressonância magnética funcional (fMRI) também são bastante heterogêneos em seus desenhos metodológicos (Spencer et al. 2013), mas os mecanismos mais consistentes propostos para explicar os efeitos benéficos do MPH envolvem a ativação do CPF inferior, dos gânglios basais e do cerebelo durante testes de funções cognitivas e executivas (Czerniak et al. 2013; Spencer et al. 2013; Rubia et al. 2014). Além disso, o MPH parece restabelecer a sincronia entre as redes DMN (do inglês, *Default Mode Network*) e TPN (do inglês, *Task-Positive Network*), que se encontra desregulada em pacientes com TDAH (Liddle et al. 2011; Querne et al. 2017).

As informações provenientes de estudos de neuroimagem estruturais e funcionais que avaliam os efeitos do MPH são muito valiosas; no entanto, poucos estudos foram conduzidos até o momento, principalmente quando se trata de desenho longitudinal. Assim, mais estudos são necessários para esclarecer as alterações cerebrais produzidas pelo tratamento agudo e crônico com MPH.

#### ***1.6.2.6. Fatores genéticos associados à susceptibilidade da resposta ao MPH***

Existem várias evidências na literatura de que a variabilidade interindividual observada na resposta a estimulantes pode ser explicada, pelo menos em parte, pela variação genética. Estudos realizados há mais de 35 anos com gêmeos avaliaram aspectos fisiológicos e subjetivos da resposta após administração de amfetamina e observaram uma concordância maior entre os gêmeos monozigóticos, sugerindo a contribuição de fatores genéticos para essas respostas (Nurnberger et al. 1982; Crabbe et al. 1983). Anos depois, Kendler e cols. (2005) estimaram a herdabilidade do uso *lifetime* de substâncias estimulantes (excluindo cocaína) em 0.42, enquanto que a da cocaína foi estimada em 0.70 (Kendler et al. 2005).

Em relação à resposta ao tratamento com MPH, nenhum estudo específico estimou a sua herdabilidade isoladamente. No entanto, diversos estudos de associação, principalmente em crianças com TDAH, apontam para uma importante contribuição genética para a variabilidade da resposta terapêutica. A mais recente meta-análise realizada em crianças aponta polimorfismos nos genes *SLC6A2/NET*, *COMT*, *ADRA2A*, *SLC6A3/DAT1* e *DRD4* como possíveis preditores da eficácia do MPH (Myer et al. 2017). O polimorfismo de número variável de repetições em tandem (VNTR) de 40 pares de bases na região 3' do gene *DAT1* é um dos mais estudados, sendo o genótipo homozigoto de 10 repetições associado a pior resposta ao MPH (Myer et al. 2017).

Tratando-se de adultos com TDAH, há uma escassez de resultados significativos em estudos farmacogenéticos do MPH (Contini et al. 2013; Rovaris et al. 2014). A meta-análise mais recente conclui que para a maioria dos polimorfismos não há estudos suficientes para conduzir meta-análises (Bonvicini et al. 2016). Nesse estudo, o único polimorfismo para o qual foi possível realizar a meta-análise foi o VNTR de 40 pares de bases no gene *DAT1*, em que não foi encontrada associação para a resposta ao MPH. Até o momento, apenas 7 estudos de gene candidato foram conduzidos para amostras de adultos com TDAH, avaliando um total de 18 genes e a maioria deles apresenta resultados nominais ou não significativos, conforme apresentado na **Tabela 1**. (Mick et al. 2006; Kooij et al. 2008; Contini et al. 2010; Contini et al. 2011; Contini et al. 2012; Hegvik et al. 2016; da Silva et al. 2018). É importante destacar que 4 desses estudos foram realizados pelo nosso grupo, sendo que um deles está apresentado no capítulo III como parte dessa Tese. Esse último demonstrou uma associação robusta entre um polimorfismo no gene

*SYT1* (rs2251214) e diversos desfechos do tratamento com MPH, incluindo a resposta sintomatológica e a persistência do uso do medicamento em curto e longo prazo (da Silva et al. 2018).

Em relação a estudos de associação em larga escala avaliando a resposta ao MPH em crianças com TDAH, nenhum resultado significativo a nível de GWAS foi encontrado (Mick et al. 2008; Payerols et al. 2018). A falta de sucesso em apontar variantes genéticas associadas está provavelmente relacionada com o pequeno tamanho amostral dos estudos, que incluíram menos de 200 indivíduos. Para adultos, nenhum GWAS em relação à resposta ao tratamento do TDAH foi realizado até o momento. No entanto, a nossa amostra de adultos foi utilizada para testar a associação dos escores de risco poligênico gerados a partir dos dados de GWAS de um desses estudos em crianças. Apesar de nenhum resultado significativo ter sido encontrado, uma análise integrativa combinando os resultados nominais provenientes desse GWAS com ferramentas de bioinformática revelou alguns candidatos promissores para a amostra de crianças, sendo que parte deles também foi replicado na nossa amostra de adultos (Payerols et al. 2018; ver capítulo IX - item 9.1.3).

É importante direcionar esforços para a realização de estudos farmacogenômicos, pois os GWAS, além de fornecerem hipóteses sobre etiologia dos transtornos e mecanismos de ação de medicamentos, apresentam a potencialidade de auxiliar na identificação de novos alvos terapêuticos. O poder destes estudos em identificar novos alvos terapêuticos pode ser avaliado através do sucesso dessa técnica em apontar alvos já conhecidos e utilizados na clínica (Cao and Moulton 2014). Um exemplo de sucesso desta abordagem envolve um dos mais importantes GWAS na área da psiquiatria, no qual uma das regiões associadas com esquizofrenia inclui o gene *DRD2*, codificador do alvo terapêutico de todos os fármacos antipsicóticos eficazes (Ripke et al. 2014).

No entanto, como mencionado anteriormente, esse tipo de estudo requer um tamanho amostral muito grande. Isso constitui um desafio ainda maior no caso de estudos farmacogenômicos, considerando a dificuldade inerente ao desenho de seguimento. Essa dificuldade é representada pelo pequeno tamanho amostral dos grupos que estudam farmacogenética do TDAH mundialmente, especialmente em adultos. Nesse cenário, é ainda mais importante a aplicação de abordagens que utilizam os dados de varredura genômica, mas que contam com técnicas com o potencial de aumentar o poder estatístico para a detecção de associações, como as análises de *gene-sets* (de Leeuw et al. 2015).

**Tabela 1.** Publicações de estudos farmacogenéticos em adultos com TDAH.

Referência	Tamanho amostral	Medicamento/ Dose	Desfecho	Gene-polimorfismo	Resultado
Mick et al. (2006)	106	IR- e OROS-MPH; 0.5-1.0 mg/kg/dia	Delta (ASRS)	<i>DAT1</i> -3' VNTR	Sem associação
Kooij et al. (2008)	42	IR- e OROS-MPH; 0.5-1.0 mg/kg/dia	Redução > 30% (ADHD-RS) + CGI-S ≤ 2.	<i>DAT1</i> -3' VNTR <i>DRD4</i> -120 bp ins/del <i>DRD4</i> - 48 bp VNTR <i>NET</i> -4 bp ins/del	<i>DAT1</i> -3' VNTR: Homozigotos para o alelo de 10 repetições apresentaram pior resposta. Não foi aplicada correção para múltiplos testes
Contini et al. (2008)	171	IR-MPH; >0.3 mg/kg/dia	Redução > 30% (SNAP-IV) + CGI-S ≤ 2.	<i>DAT1</i> -rs2652511 <i>DAT1</i> -Int8 VNTR <i>DAT1</i> -3' VNTR	Sem associação
Contini et al. (2011)	165	IR-MPH; >0.3 mg/kg/dia	Redução > 30% (SNAP-IV) + CGI-S ≤ 2.	<i>ADRA2A</i> -rs1800544 <i>ADRA2A</i> -rs1800545 <i>ADRA2A</i> -rs553668	Sem associação
Contini et al. (2012)	164	IR-MPH; >0.3 mg/kg/dia	Redução > 30% (SNAP-IV) + CGI-S ≤ 2.	<i>HTR1B</i> -rs11568817 <i>HTR1B</i> -rs6296 <i>HTR1B</i> -rs13212041 <i>SLC6A4</i> -5-HTTLPR <i>TPH2</i> -rs1843809 <i>TPH2</i> -rs4570625 <i>DBH</i> -rs1611115 <i>DRD4</i> -48 bp VNTR <i>COMT</i> -rs4680 <i>SNAP25</i> -rs3746544 <i>SNAP25</i> -rs363020	Sem associação



Hegvik et al. (2016)	564	IR-MPH; ER-MPH	Questionário personalizado para classificação de respondedores e não respondedores.	<p><i>GRM7</i>-rs3792452  <i>DRD5</i>-18.5 kb 5-prime VNTR  <i>LPHN3</i>-rs6551665  <i>LPHN3</i>-rs6858066  <i>LPHN3</i>-rs2345039  <i>DAT1</i>-rs2963238  <i>DAT1</i>-rs2652511  <i>DAT1</i>-3'UTR VNTR  <i>ADRA2A</i>-rs1800544  <i>ADRA2A</i>-rs553668  <i>DRD4</i>-Exon 3 VNTR  <i>BDNF</i>-rs6265  <i>BDNF</i>-rs61888800  <i>NET</i>-rs28386840  <i>NET</i>-rs192303  <i>SNAP25</i>-rs3746544  <i>SNAP25</i>-rs1051312  <i>COMT</i>-rs4680</p>	<p><i>ADRA2A</i>-rs1800544: Maior frequência de portadores do alelo G entre não-respondedores.</p> <p>Essa associação não sobreviveu à correção para múltiplos testes e não foi apoiada por meta-análise.</p>
da Silva et al. (2018)	272 para os desfechos 1 e 2. 433 para o desfecho 3.	IR-MPH; >0.3 mg/kg/dia	<p>1. Redução 30% (SNAP-IV) + CGI-I <math>\leq</math> 2 + média <math>\leq</math> 1 (SNAP-IV).  2. Percentual de redução (SNAP-IV).  3. Status de continuidade do tratamento</p>	<p><i>STX1A</i>-rs2228607  <i>SYT1</i>-rs1880867  <i>SYT1</i>-rs2251214  <i>VAMP2</i>-ins/del 26bp</p>	<p><i>SYT1</i>-rs2251214: Homozigotos GG apresentaram pior resposta e abandonam o tratamento com maior frequência do que portadores do alelo A.</p> <p>As associações sobreviveram à correção para múltiplos testes.</p>

*IR-MPH* immediate-release methylphenidate; *OROS* osmotic release oral system; *ER* extended release; *ASRS* adult ADHD self-report scale; *SNAP-IV* Swanson, Nolan and Pelham teacher and parent rating scale; *CGI-S/I* clinical global impression-severity/improvement.

## **CAPÍTULO II**

---

### **Justificativa e Objetivos**

## 2.1. Justificativa

Os principais desafios enfrentados por profissionais da saúde que estudam e atendem pacientes com TDAH envolvem a grande heterogeneidade clínica e a complexidade biológica envolvida na fisiopatologia desse transtorno, que apresenta etiologia multifatorial. Esse cenário, associado a um ceticismo que muitas vezes levanta o debate sobre a validade do diagnóstico e seu tratamento, torna ainda mais complexa a busca por um tratamento adequado que atenda às necessidades do paciente de forma rápida, eficaz e segura. As dificuldades referentes ao ajuste do tratamento e o tempo prolongado que frequentemente são observados para o manejo dos sintomas até que uma resposta satisfatória seja alcançada, causam um impacto negativo enorme na vida do indivíduo, que se estendem para os âmbitos familiar e social, bem como para o ambiente de trabalho e/ou acadêmico.

Apesar de o MPH ser o medicamento mais utilizado para o tratamento do TDAH há mais de 50 anos e apresentar eficácia e segurança sustentadas por diversas meta-análises (Catalá-López et al. 2017; Cortese et al. 2018), existe uma grande variabilidade em relação à dose necessária, ao perfil de resposta sintomatológica e de tolerabilidade, e uma proporção considerável de pacientes interrompe o tratamento ao longo do tempo (Spencer et al. 1996; Gajria et al. 2014). A necessidade de um tratamento adequado, que previna ou reduza os desfechos prejudiciais decorrentes da presença crônica dos sintomas de TDAH, impulsiona a investigação de fatores que possam influenciar a resposta ao tratamento.

Neste contexto, a presente Tese, que com diferentes metodologias busca o esclarecimento do papel de um mecanismo potencialmente central para as ações do MPH, auxiliará na elucidação das ações farmacológicas e variabilidade da resposta ao tratamento com MPH. Um conhecimento mais profundo a respeito dos mecanismos moleculares subjacentes às suas ações poderá auxiliar na compreensão da fisiopatologia do TDAH em si, além de contribuir para a orientação à terapêutica de pacientes que não respondem adequadamente ao tratamento com MPH, e possivelmente para a identificação de novos alvos terapêuticos em estudos futuros.

## 2.2. Objetivos

### 2.2.1. Objetivo geral

Investigar com uma perspectiva translacional a resposta ao MPH no tratamento do TDAH, tendo como foco principal a via da exocitose de neurotransmissores.

### 2.2.2. Objetivos específicos

- Testar a associação dos polimorfismos em genes do complexo SNARE com uma ampla gama de desfechos relacionados à resposta ao tratamento com MPH em adultos com TDAH (capítulo III);

- Explorar em uma perspectiva genômica através da abordagem de *gene-sets* o efeito de vias relacionadas à liberação de neurotransmissores sobre a resposta ao tratamento com MPH em adultos com TDAH (capítulo IV);

- Realizar a análise proteômica exploratória das alterações induzidas por MPH no córtex cerebral de ratos WKY, com posterior enriquecimento funcional em vias biológicas (capítulo V);

- Avaliar o papel das vias biológicas inferidas pela análise proteômica em análises de *gene-sets* envolvendo a resposta ao MPH na amostra clínica de adultos com TDAH (capítulo V);

### 2.2.3. Objetivos complementares

- Avaliar os efeitos de um polimorfismo (*SYT1*-rs2251214) especialmente implicado na resposta ao MPH sobre a susceptibilidade ao transtorno por uso de cocaína (capítulo VI);

- Realizar a análise proteômica das alterações induzidas por MPH no córtex cerebral de ratos SHR (modelo animal para o TDAH), sob uma perspectiva voltada para a comparação com os achados prévios em ratos WKY e validação dos resultados mais consistentes (capítulo VII - item 7.1);

- Avaliar os efeitos do MPH e da super-expressão da *Syt1*, isolados ou combinados, na morfologia dendrítica de neurônios primários a fim de avaliar as relações entre o gene e o medicamento em mecanismos de plasticidade sináptica (capítulo VII – item 7.2);

## CAPÍTULO III

---

Exocytosis-related genes and response to methylphenidate treatment in adults with ADHD. *Mol Psychiatry* 23:1446–1452 (2018).

## CAPÍTULO IV

---

Neurotransmitter exocytosis pathways and response to methylphenidate treatment in adults with ADHD.

*Em preparação.*

## CAPÍTULO V

---

Differential proteomics of methylphenidate treatment reveals a potential link between synaptic neurotransmission and variability of therapeutic response. *Em preparação.*

## CAPÍTULO VI

---

### **Artigo complementar**

The association between *SYT1*-rs2251214 and cocaine use disorder further supports its role in psychiatry. Submetido para *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*



## Breve contextualização referente ao artigo complementar

---

O artigo apresentado neste capítulo é parte de uma abordagem complementar que visa à extensão de um conjunto intrigante de achados envolvendo um polimorfismo específico em um gene envolvido na exocitose de neurotransmissores (*SYT1*-rs2251214). Esses resultados prévios demonstraram um efeito desse polimorfismo na susceptibilidade ao TDAH (Sánchez-Mora et al. 2013; Cupertino et al. 2017) e outros fenótipos externalizantes relacionados (Cupertino et al. 2017), bem como em diferentes desfechos da resposta ao tratamento com MPH (da Silva et al. 2018; capítulo III da Tese). Associações envolvendo outros genes da via de liberação de neurotransmissores também já foram relatadas para a susceptibilidade e gravidade da dependência de cocaína (Fernández-Castillo et al. 2012).

Ainda que o foco principal dessa Tese envolva o estudo do tratamento do TDAH com o MPH, algumas particularidades instigaram a busca pelo papel desse polimorfismo também na dependência de cocaína, como forma de complementar o conhecimento do sistema de exocitose sobre a ação de estimulantes de maneira mais ampla. Uma das constatações que basearam a hipótese envolve o fato de que indivíduos com transtornos por uso de substâncias apresentam com maior frequência transtornos externalizantes em comorbidade e que fatores genéticos comuns contribuem para esses fenótipos (Arcos-Burgos et al. 2012). Sabe-se ainda que a cocaína compartilha os mesmos alvos terapêuticos do MPH. Ambas agem como bloqueadoras da recaptação de DA e NE e compartilham muito mais propriedades farmacológicas entre si do que quando comparadas à outras substâncias pertencentes à mesma classe farmacológica (Heal et al. 2014). Assim, no contexto dos resultados sugerindo um efeito do polimorfismo *SYT1*-rs2251214 tanto na suscetibilidade a fenótipos externalizantes como na resposta ao também estimulante MPH, a hipótese de envolvimento dessa variante também foi testada no transtorno por uso de cocaína.

O artigo resultante está apresentado a seguir e foi submetido para a revista *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, com o título “*The association between SYT1-rs2251214 and cocaine use disorder further supports its role in psychiatry.*”

## **CAPÍTULO VII**

---

Dados e projetos complementares

## **7.1. Análise proteômica das alterações induzidas por MPH no córtex de ratos espontaneamente hipertensos (SHR).**

Este projeto prevê a expansão das análises de proteômica no cérebro de ratos WKY que resultou no artigo apresentado no capítulo V para um modelo animal de TDAH, o SHR. A análise dos dados ainda está em andamento, de forma que o texto a seguir descreve somente o embasamento do projeto.

### *7.1.1. Introdução*

O estudo dos sistemas biológicos de modelos animais para o TDAH tem sido considerado de grande utilidade para um entendimento mais profundo das características complexas desse transtorno psiquiátrico. Mesmo que, obviamente, este tipo de estudo não substitua os estudos clínicos, ele os complementa, permitindo a utilização de grupos geneticamente homogêneos, maior controle do ambiente e a possibilidade de uma ampla variedade de intervenções. Além de apoiar resultados provenientes de estudos clínicos, a abordagem pode gerar novas hipóteses em relação à fisiopatologia e tratamento do TDAH (Russell 2011). A utilização desses modelos permite a realização de experimentos difíceis de serem conduzidos em humanos, como, por exemplo, a avaliação de tecido cerebral *post-mortem*.

Dentre os diversos modelos animais existentes para o estudo do TDAH, o mais utilizado e que melhor representa a condição de TDAH em humanos é o SHR. Essa linhagem foi desenvolvida inicialmente como modelo para hipertensão, a partir do cruzamento seletivo de ratos WKY que apresentavam pressão sanguínea sistólica elevada, sendo em seguida observado que esses animais eram mais hiperativos que o seu progenitor. Os SHR apresentam os principais sintomas comportamentais do TDAH (desatenção, hiperatividade e impulsividade) (Sagvolden 2000), além de exibirem modificações no sistema dopaminérgico muito similares àquelas observadas em indivíduos com TDAH, como reduzida liberação de DA e menor expressão do gene *DRD4* no CPF (Li et al. 2007). Essa linhagem desenvolve hipertensão apenas na vida adulta (de 12 a 14 semanas após o nascimento), não estando presente nos ratos jovens hiperativos antes desse período. Os ratos WKY são utilizados como controles normotensos para os SHR (Sagvolden and Johansen 2012).

Os SHR possuem ainda outras características relevantes para a etiologia do TDAH. Por exemplo, maiores concentrações do receptor de DA do tipo D1 e D5 foram observadas no estriado e núcleo *accumbens* desses animais (Carey et al. 1998). Também merece destaque uma inserção de 160 pb na região *upstream* ao exon 3 do gene *DAT* dos SHR (Mill et al. 2005), sendo essa característica muito importante considerando os diversos estudos clínicos associando polimorfismos nesse gene com o TDAH (Gizer et al. 2009). Essa linhagem apresenta ainda expressão reduzida do mRNA do *Snap25* no CPF (Li et al. 2009), corroborando resultados de estudos em humanos que mostram associação do gene *SNAP25* com o TDAH (Liu et al. 2016). Ainda nesse modelo, foi demonstrado que os sistemas catecolaminérgicos, principalmente o dopaminérgico, encontram-se hipofuncionais em regiões específicas do cérebro (estriado, núcleo *accumbens* e CPF), e que essa condição provavelmente explica o comportamento característico relacionado ao transtorno (Miller et al. 2012; Miller et al. 2013), corroborando estudos clínicos e psicofarmacológicos prévios (Wilens 2008).

O capítulo V da tese apresenta os resultados já obtidos sobre o perfil proteômico em ratos WKY tratados com MPH, com o enriquecimento funcional e a utilização da abordagem combinada com a genômica em uma amostra clínica. Tais dados apontam as vias moduladas pelo MPH, cuja variabilidade genética por sua vez também influencia a resposta ao tratamento. No entanto, as hipóteses geradas em WKY representam um contexto independente do TDAH. Nesse sentido, a utilização do modelo SHR com a aplicação da mesma metodologia permitirá a interpretação conjunta desses dados, com a avaliação sobre as alterações de proteínas e vias biológicas compartilhadas em ambas as condições ou específicas para cada uma delas.

### 7.1.2. Objetivos

O objetivo desse projeto é realizar a análise proteômica das alterações induzidas por MPH no córtex cerebral de ratos SHR (modelo animal para o TDAH), sob uma perspectiva voltada para a comparação com os achados prévios com os ratos WKY e validação dos resultados mais consistentes

### 7.1.3. Metodologia

O desenho experimental segue as mesmas etapas descritas para a análise proteômica em ratos WKY tratados com MPH e apresentado no capítulo V (representada na Figura 1 do artigo), porém utilizando o modelo animal para TDAH (SHR). Os métodos para identificação e análise proteômica, com o enriquecimento funcional em vias biológicas, também serão os mesmos. No entanto, as análises posteriores permitirão comparar os dois grupos de resultados considerando ou não a sobreposição dos achados entre os WKY e SHR, ou seja, as vias biológicas compartilhadas entre os modelos e aquelas específicas do contexto biológico próprio do TDAH. Tais comparações podem propiciar novas hipóteses de análises *gene-set* no contexto clínico, ao relacionar vias biológicas com padrões sintomatológicos.

### 7.1.4. Andamento do projeto e perspectivas

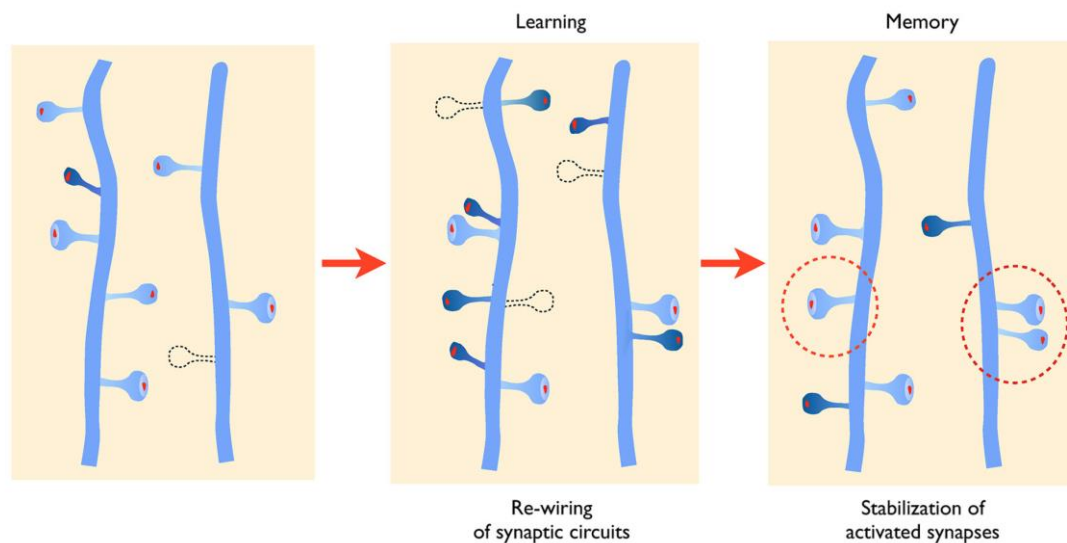
Toda a etapa experimental de tratamento dos SHR com MPH, isolamento do cérebro para dissecação do córtex e extração de proteínas já foram realizadas (ver capítulo V; *Methods*). As amostras foram enviadas para o *Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute*, La Jolla, CA e encontram-se em procedimento de identificação e quantificação do proteoma. A previsão é que a análise proteômica e redação do artigo sejam realizados ainda no ano de 2019.

## **7.2. Efeitos do MPH e da super-expressão de *Syt1* na morfologia dendrítica de neurônios primários**

Este projeto contempla o período “sanduíche” com duração de 6 meses que foi desenvolvido no *Laboratory of Translational Psychiatry, Universitätsklinikum*, Frankfurt, Alemanha, sob supervisão do Prof. Dr. Andreas Reif e co-supervisão do Dr. Florian Freudenberg. Como ainda não obtivemos os resultados, a descrição do projeto e as etapas metodológicas realizadas no exterior durante esse período estão apresentadas a seguir.

### *7.2.1. Introdução*

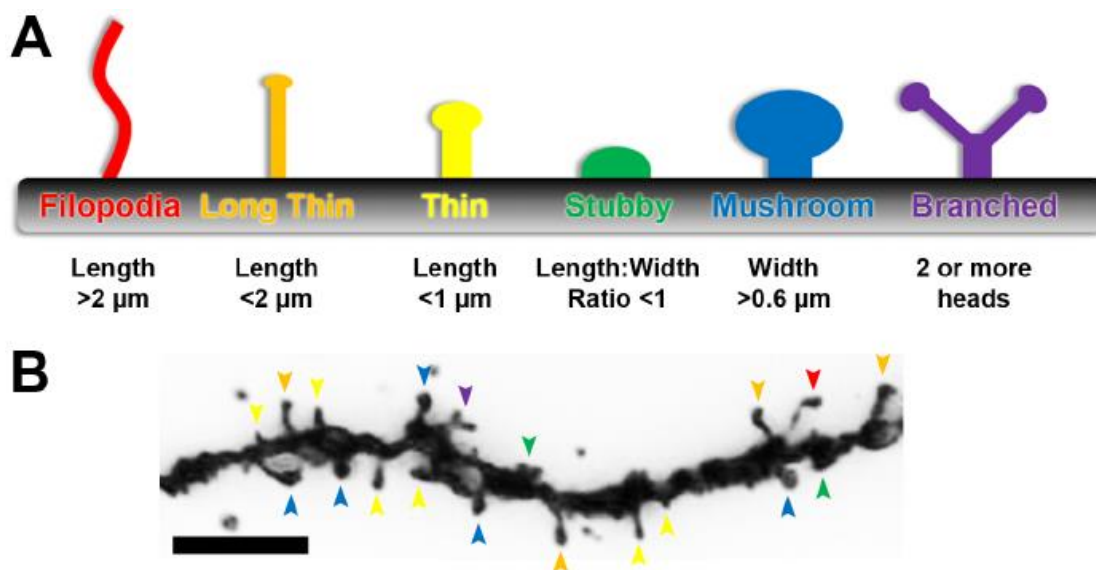
O processamento da informação cerebral é criticamente influenciado por alterações das propriedades funcionais da conectividade sináptica, mudanças na força sináptica e formação e estabilização de conexões (Qiu et al. 2011). O principal sítio de formação dessas sinapses são os espinhos dendríticos, sendo que variações na densidade e morfologia dessas estruturas, que podem ocorrer em resposta a experiências, determinam a estabilidade e a força de uma sinapse. Essas adaptações são capazes de modular os mecanismos de conectividade sináptica e plasticidade neuronal, as quais estão envolvidas em processos de aprendizado e memória (Leuner et al. 2003; Sutton and Schuman 2006). Por exemplo, a expansão dos espinhos vem sendo associada com o mecanismo de LTP (Yang et al. 2008), enquanto que o encolhimento dessas estruturas é relacionado com LTD (Zhou et al. 2004). Ambos são fatores envolvidos na plasticidade neuronal sináptica e implicados no aprendizado e memória. A formação de novos espinhos parece ser importante para o aprendizado, enquanto que sua estabilização e maturação estão envolvidas nos processo de formação de memória, conforme ilustrado na **Figura 5** (Bernardinelli et al. 2014).



**Figura 5. Plasticidade estrutural mediada por atividade.** À esquerda: as redes sinápticas são caracterizadas por um processo regulado de crescimento (espinho azul escuro) e eliminação (linha pontilhada) dos espinhos. Meio: durante atividades de aprendizado ocorre aumento da formação e eliminação de contatos sinápticos, permitindo o remodelamento e adaptação da conectividade. À direita: os novos espinhos formados e as sinapses ativas são preferencialmente estabilizadas (círculos pontilhados vermelhos), permitindo a manutenção das conexões funcionais importantes. A versão original da legenda e figura podem ser encontradas em Bernardinelli et al. 2014.

As alterações morfológicas possíveis na estrutura dos dendritos incluem a arborização dendrítica, a quantidade e tamanho dos espinhos e a forma/tipo de espinho (**Figura 6**). Essas modificações ocorrem dentro de diferentes escalas temporais, podendo variar de minutos até dias, sendo que os espinhos dendríticos sofrem mudanças de forma mais dinâmica do que os dendritos em neurônios maduros. Os espinhos normalmente medem menos que 2  $\mu\text{m}$  e se desenvolvem morfológicamente a partir de protrusões finas e longas ou *filopodia* até espinhos maduros com uma forma morfológica definida, como os *mushrooms* (**Figura 6**) (Risher et al. 2014).

Os espinhos do tipo *filopodia* são considerados os mais imaturos, pois eles aparecem com maior frequência em um estágio precoce do desenvolvimento e normalmente não apresentam sinapses funcionais. Esse tipo de espinho é mais susceptível a ser eliminado ao longo do tempo e está relacionado ao aprendizado. Por outro lado, os espinhos do tipo *mushroom* são considerados maduros, estáveis nas sinapses e relacionados aos processos de estabilização da memória (Bourne and Harris 2007).



**Figura 6. Características geométricas para a identificação dos espinhos dendríticos.** (A) Espinhos dendríticos comuns encontrados no córtex e seu progresso de maturação (da esquerda para a direita) a partir de estruturas longas e finas do tipo *filopodia* (vermelho) até os espinhos do tipo *mushroom* (azul) e eventualmente os ramificados (roxo). (B) Árvore dendrítica de neurônios piramidais do córtex de ratos corado pelo método de Golgi-cox. Os diferentes espinhos estão indicados pelas setas de acordo com as cores apresentadas em (A). A versão original da legenda e figura, bem como a caracterização do método de classificação, podem ser encontrados em Risher et al. 2014.

Considerando que as mudanças estruturais que ocorrem nos espinhos dendríticos estão fortemente relacionadas à funcionalidade das sinapses e parecem afetar processos cognitivos, pequenas alterações podem ter um grande impacto na plasticidade e conectividade dendrítica, as quais vêm sendo implicadas na sintomatologia de transtornos psiquiátricos do neurodesenvolvimento, como o TDAH (Forrest et al. 2018).

Pacientes com TDAH apresentam déficit em funções cognitivas, como memória de trabalho, atenção sustentada e aprendizado, que parecem melhorar após o tratamento com MPH (Britton 2012; Tamminga et al. 2016). O mecanismo pelo qual o MPH exerce essas ações ainda é desconhecido; no entanto, através do registro do potencial pós-sináptico excitatório em cortes de hipocampo de ratos já foi demonstrada uma capacidade do MPH de aumentar ambos os mecanismos de LTD e LTP, processos previamente associados com alterações na morfologia dendrítica (Dommett et al. 2008; Jenson et al. 2015; Rozas et al. 2015). Além disso, a exposição ao MPH foi associada a alterações na densidade dos espinhos dendríticos em regiões relacionadas à recompensa, o que pode estar ligado à



plasticidade neuronal (Kim et al. 2009), sugerindo que esse possa ser um dos mecanismos através dos quais o MPH exerce seus efeitos nas funções cognitivas.

Além disso, considerando a hipótese do envolvimento de mecanismos de liberação de neurotransmissores nas ações do MPH, especialmente a associação farmacogenética encontrada envolvendo o gene *Syt1* (capítulo III), a investigação em nível molecular das diferenças entre o tratamento em condições normais ou alteradas nesses componentes é bastante promissora para elucidar suas possíveis funções nas ações do MPH. Por exemplo, a avaliação dos efeitos da indução de diferenças na expressão da *Syt1* sobre a morfologia dendrítica de células neuronais tratadas ou não com MPH poderá revelar o envolvimento dos mecanismos de plasticidade sináptica nas funções da proteína e nas ações desse medicamento. Na verdade, existem evidências de que a *Syt1* é capaz de regular a morfologia neuronal em vários níveis. Uma translocação dependente de  $Ca^{2+}$  da *Syt1* para a membrana plasmática de dendritos durante a despolarização foi demonstrada em neurônios do hipotálamo, contribuindo para a modulação da arborização dendrítica (Schwab et al. 2001). A super-expressão de *Syt1* também já foi associada à formação de novos axônios, sendo importante para a diferenciação axonal (Greif et al. 2013; Inoue et al. 2015). É possível que as alterações de morfologia neuronal observadas com as diferenças de expressão da *Syt1* impactem as funções cognitivas.

Essa ideia é corroborada por estudos sugerindo que a medida dos níveis da SYT1 no fluido cerebrospinal pode ser útil como biomarcador precoce para o declínio cognitivo da doença de Alzheimer. Os níveis de SYT1 foram significativamente maiores em pacientes com prejuízo cognitivo moderado ou com demência devido ao Alzheimer quando comparados a controles (Öhrfelt et al. 2016), sugerindo que essas medidas podem auxiliar no monitoramento da degradação sináptica e consequente prejuízo cognitivo. Apesar de o processo pelo qual a SYT1 poderá exercer seu papel em funções cognitivas ainda não ser claro, o envolvimento de alterações na morfologia dendrítica é bastante plausível.

Assim, a avaliação da relação entre o uso de MPH e superexpressão da *Syt1* na morfologia dendrítica pode auxiliar no entendimento de mecanismos de ação dessa proteína e sugerir novas hipóteses envolvendo a fisiopatologia e o tratamento do TDAH.

### 7.2.2. *Objetivo*

O objetivo deste projeto é avaliar os efeitos do MPH e da super-expressão da *Syt1*, isolados ou combinados, na morfologia dendrítica de neurônios primários a fim de avaliar as relações entre o gene e o medicamento em mecanismos de plasticidade sináptica

### 7.2.3. *Metodologia*

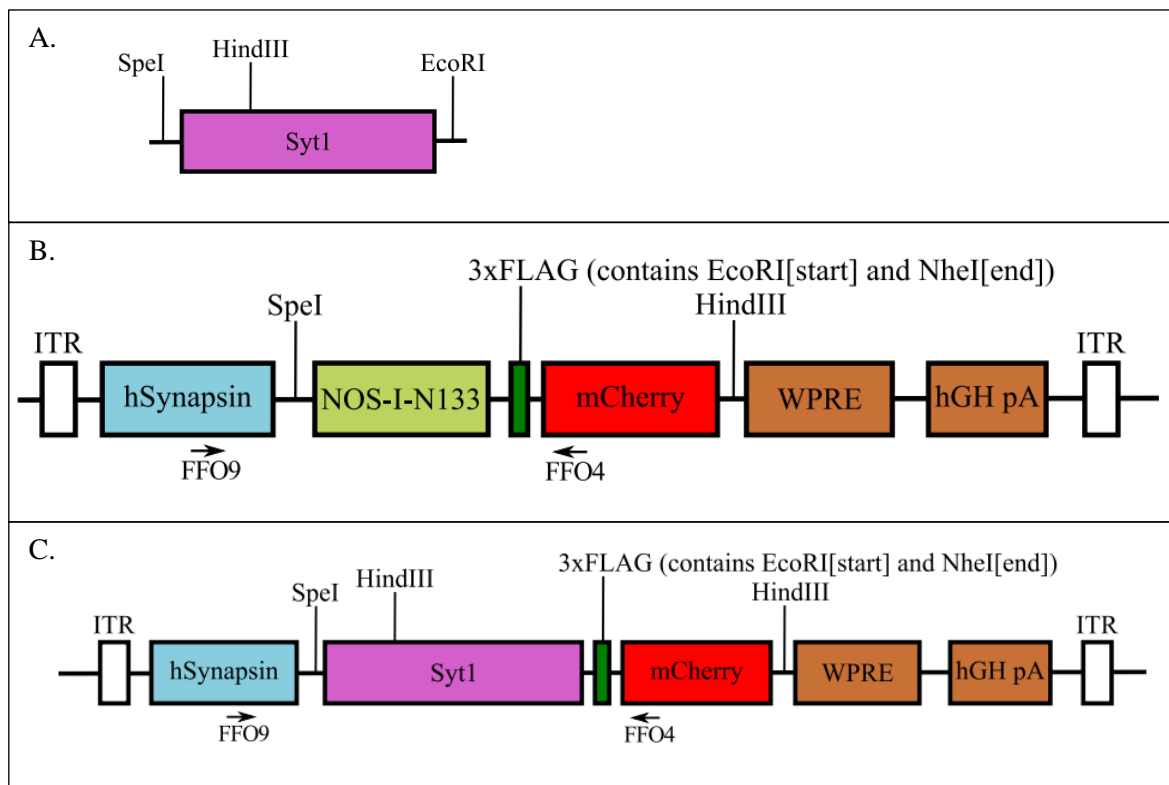
#### 7.2.3.1. *Animais*

Camundongos C57BL/6J *wild-type* foram utilizados para o isolamento de neurônios primários. Os animais foram mantidos em condições ambientais controladas (temperatura de  $21\pm 1^\circ\text{C}$  e umidade de  $55\pm 5\%$ ) e com água e alimentação disponíveis *ad libitum*. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com os guias e leis da Europa e Alemanha: *Directive of the European Communities Council of 24 November 1986 (86/609/EEC)* e *German animal welfare laws (TierSchG and TSchV)* e foram aprovados por autoridades locais.

#### 7.2.3.2. *Produção dos vetores virais*

Para a construção e clonagem de um vírus adeno-associado (AAV) expressando o gene *Syt1*, o produto de PCR da região codificadora do gene *Syt1* foi utilizado como sequência de inserção (**Figura 7.a**). O cDNA utilizado para o PCR foi sintetizado a partir de RNA, o qual foi extraído utilizando RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen) a partir de tecido cerebral de camundongos. Foi utilizado como molde um vetor plasmidial contendo uma variante do gene *Nos1*, o sinalizador mCherry e outros elementos necessários para a expressão gênica (**Figura 7.b**). Esse vetor molde está descrito em Candemir et al. (2016).

A digestão com enzimas de restrição foi realizada para o produto de PCR do *Syt1* com SpeI/EcoRI e para o vetor plasmidial com NheI/HindIII. Após a clivagem, os produtos sofreram uma reação de ligação através da enzima de ligação T4 ligase. O construto esperado após a ligação contém a inserção da *Syt1* e todos os outros elementos necessários e facilitadores de expressão (**Figura 7.c**).



**Figura 7. Representação esquemática da estratégia utilizada para a construção do vetor plasmidial expressando *Syt1*.** **A.** Região codificadora do gene *Syt1* (produto de PCR). **B.** Vetor plasmidial utilizado como molde para obter o construto final. **C.** Construto final do vetor plasmidial após as reações de clivagem e ligação: AAV-hSyn-Syt1.3xFLAG.mCherry-WPRE (abreviado neste capítulo como AAV-Syt1).

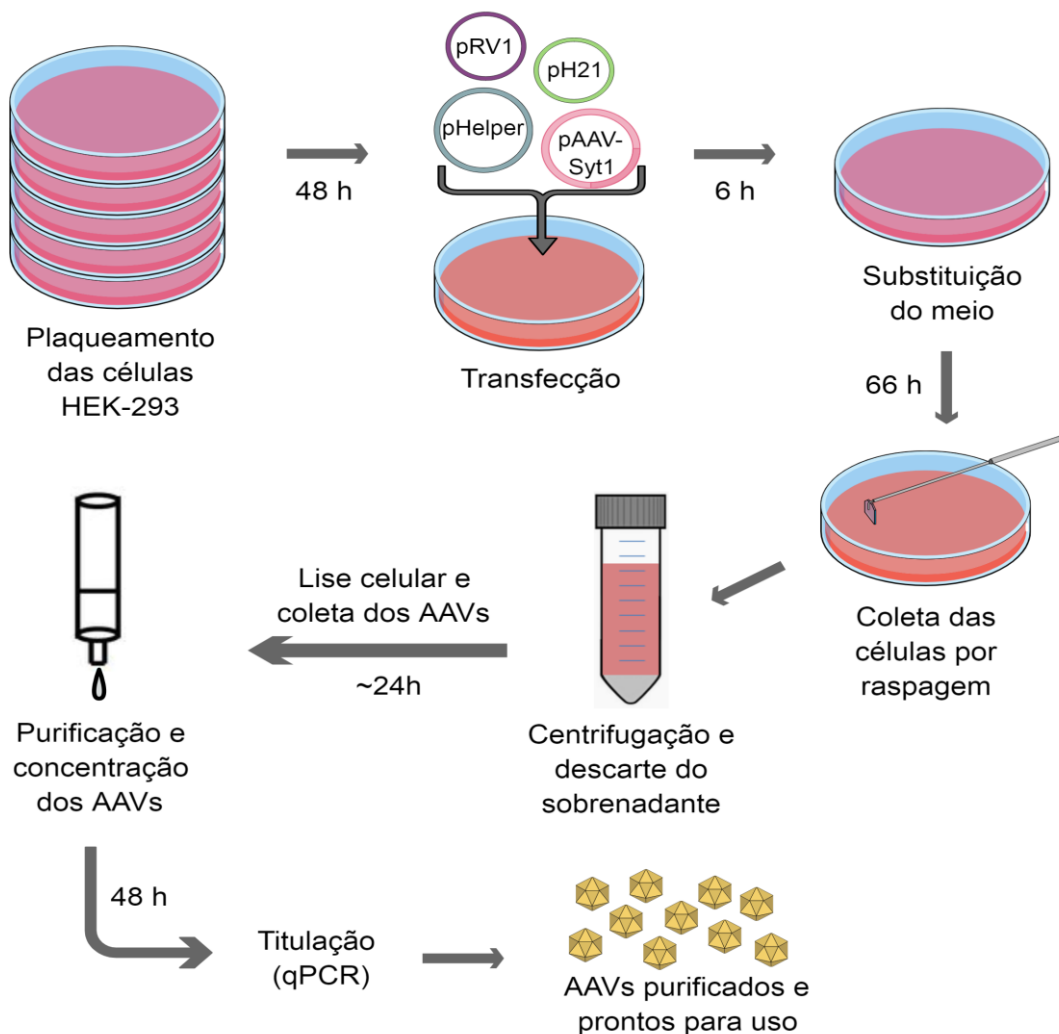
Para confirmar se o produto da ligação obtido continha a sequência desejada, foram transformadas células competentes de *E. coli* (One shot™ STBL3™). O volume total da suspensão de células de *E. coli* contida no tubo original foi misturada a 5 uL do produto da ligação e a mistura mantida em gelo por 30 minutos. Após esse período, a mistura foi incubada a 42°C por 45 segundos e imediatamente recolocada no gelo por 2 minutos para promover o choque térmico. Ao final, foi adicionado 250 uL do meio de crescimento bacteriano (*Super Optimal broth with Catabolite repression* - SOC) Essa solução foi mantida a 37°C por 1 hora sob agitação a 225 rpm e a seguir plaqueada em placas de Petri contendo aproximadamente 15 mL de meio Luria-Bertani (LB) sólido suplementado com o antibiótico ampicilina a uma concentração final de 0,1%. As placas foram incubadas *overnight* a 37°C em estufa.

Colônias resultantes da incubação foram randomicamente coletadas e cultivadas em meio LB líquido + ampicilina 0.1% por 16 horas sob agitação a 200 rpm para posterior

extração do DNA plasmidial. A extração dos DNAs plasmidiais das colônias coletadas foi realizada com o kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega). Os DNAs plasmidiais provenientes das colônias foram submetidos à reação de PCR utilizando um par de *primers* desenhados especificamente para amplificar uma região contendo o gene *Syt1* a partir do novo construto (FF09 e FF04; ver localização aproximada na **Figura 7.c**). As reações positivas foram clivadas com a enzima HindIII. Os DNAs das reações contendo os tamanhos corretos de banda após a clivagem (4.991 pb e 1.621 pb) foram enviados para sequenciamento utilizando os mesmos *primers* da reação de PCR. O DNA da isoforma completa do gene *Syt1* foi utilizada para a produção dos vetores virais. A linhagem celular HEK AAV-293 foi utilizada para a transfecção seguindo o protocolo de produção, purificação e titulação de vetores virais adeno-associados descrito por McClure et al. 2011 e esquematizado na **Figura 8**.

#### **7.2.3.3. Cultura de neurônios primários de córtex e hipocampo**

O isolamento das células foi realizado a partir do cérebro de filhotes recém-nascidos (dia pós-natal 0 – P0) de ratos C57BL/6J conforme descrito por Beaudoin et al. 2012. Brevemente, as regiões do córtex e hipocampo foram dissecadas com o uso de um estereomicroscópio e mantidas em solução salina tamponada Hank (HBSS) em gelo. Em uma capela de fluxo laminar, o HBSS foi aspirado e os tecidos foram incubados em tampão fosfato-salino (PBS) contendo 0.05% tripsina/ 0.02% EDTA por 5 minutos em banho-maria a 37°C. O tampão contendo tripsina foi removido, os tecidos foram lavados com HBSS por três vezes e triturados em 2,5 mL do meio de cultura *Neurobasal medium* (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 2% de suplemento B27 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 1% L-Glutamina e 1% Penicilina/Streptomicina. As células foram plaqueadas em uma densidade de 200.000 células/poço para o hipocampo e 300.000/poço para o córtex em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro de 12 mm pré-tratadas com poli-D-lisina (0.1 mg/mL; Sigma Aldrich, St. Louis, Mo, USA). As células foram mantidas no mesmo meio de cultura em que foram plaqueadas. O meio foi trocado completamente nas primeiras 6h de cultura e posteriormente a metade do seu volume foi substituída a cada 3 dias. Após 3 dias *in vitro* (DIV3), o inibidor mitótico arabinoside citosina foi adicionado a uma concentração final de 2.5 uM para reduzir o crescimento de células não neuronais.



**Figura 8. Ilustração esquemática do protocolo para produção e purificação de vetores virais adeno-associados (AAV).** Células HEK-293 foram plaqueadas e mantidas incubadas a 37°C e atmosfera de 5% CO<sup>2</sup> para crescimento até 70-80% de confluência (~48 h). O vetor plasmidial de interesse (AAV-Syt1) e outros plasmídios (pH21, pRV1, pHelper) contendo os elementos necessários para a produção dos vírus foram transfectados nas células HEK-293. O meio de cultura foi trocado 6 horas após a transfecção e as células foram mantidas em cultura por mais 66 horas, momento em que foram coletadas em suspensão por raspagem. O processo de lise das células e coleta dos AAVs iniciou-se com a centrifugação, descarte do sobrenadante e ressuspensão do pellet em tampão. Após um ciclo de congelamento (~5h) e descongelamento a suspensão foi tratada com Benzonase/NaDOC, incubada a 37°C em banho-maria por 1h, centrifugada para remoção de restos celulares e submetida a um novo ciclo de congelamento (*overnight*) e descongelamento antes da purificação. As partículas virais foram então purificadas através de colunas de heparina utilizando uma bomba peristáltica e diferentes concentrações de solução contendo NaCl + Tris para os ciclos de lavagem e eluição final. A concentração e esterilização foram feitas em filtro de centrífuga Amicon® Ultra-4. Por fim, a titulação foi realizada a partir da curva padrão de diluições seriadas com concentrações medidas através de PCR quantitativo. Nesse momento, foram obtidos os AAVs purificados e prontos para uso. Figura criada utilizando a plataforma *Mind the Graph*.

#### 7.2.3.4. Infecção com o AAV-Syt1 e tratamento com MPH

As células neuronais foram infectadas após 7 dias em cultura (DIV7) de acordo com os diferentes grupos de infecção e tratamento. Os AAVs 6P-SEWB previamente construídos (descrito por Candemir et al. 2016) para a expressão de eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) foi utilizado para co-infectar as células em todas as diferentes condições, como um marcador. O vetor expressando mCherry previamente construído (descrito por Candemir et al. 2016) foi utilizado como controle para as comparações com as células infectadas com vetores expressando *Syt1*. As células das condições reservadas para expressar o AAV-Syt1 foram infectadas com  $2 \times 10^6$  partículas virais/poço. Os neurônios super-expressando apenas mCherry ou *Syt1* foram tratados no DIV9 com uma única dose em 3 diferentes concentrações finais de MPH (0.2  $\mu$ M, 2  $\mu$ M ou 20  $\mu$ M) ou veículo como controle. Seis horas após o tratamento, as células foram fixadas com solução contendo 4% paraformaldeído/4% sacarose em tampão 1x PBS por 10 minutos e lavadas com 1x PBS. As lamínulas contendo os neurônios aderidos foram montadas em lâminas de vidro (Superfrost, ThermoFisher Scientific) usando o meio de montagem *ProLong™ Diamond Antifade Mountant with DAPI* (ThermoFisher Scientific). Cada condição inclui 5 replicatas, sendo 3 poços reservados para cada condição em cada uma das replicatas experimentais.

#### 7.2.3.5. Aquisição das imagens dos neurônios

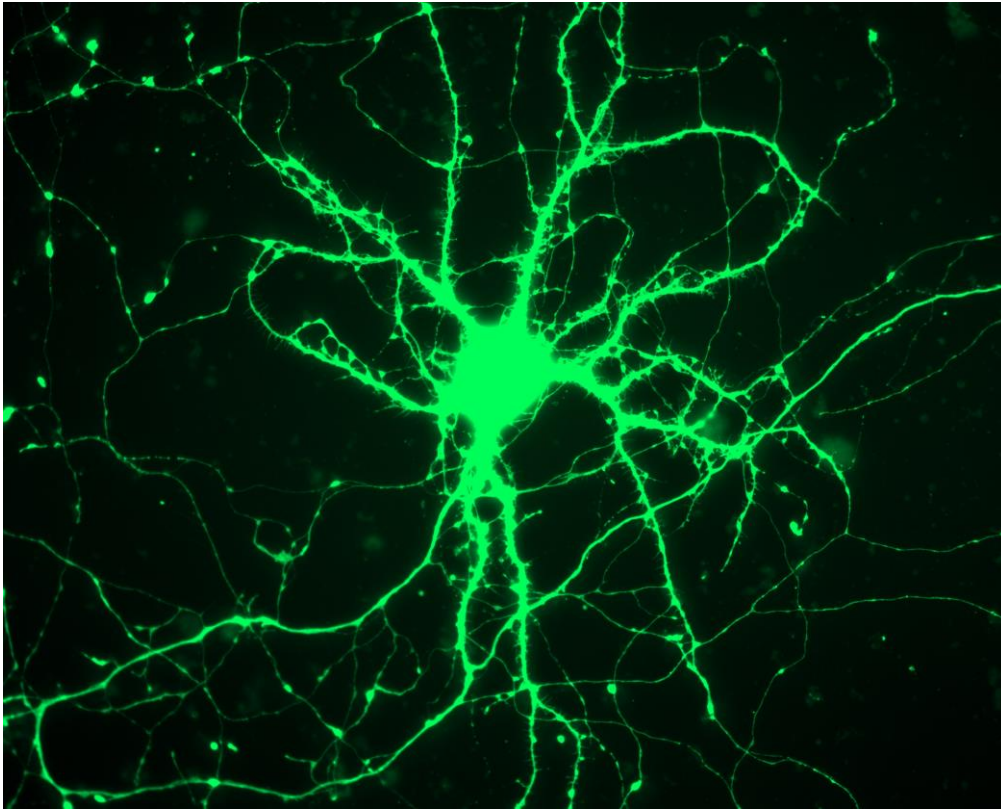
As lâminas montadas contendo os neurônios primários foram visualizadas em microscópio invertido (Zeiss Axio Observer Z1 + Colibri 2 LED lightsource) e as imagens capturadas utilizando objetiva de 40x ou 100x com óleo de imersão. Neurônios positivos para imunofluorescência eGFP (**Figura 9**) e/ou mCherry (**Figura 10**) foram escolhidos para a aquisição de imagens e análises posteriores.

#### 7.2.4. Andamento do projeto e perspectivas

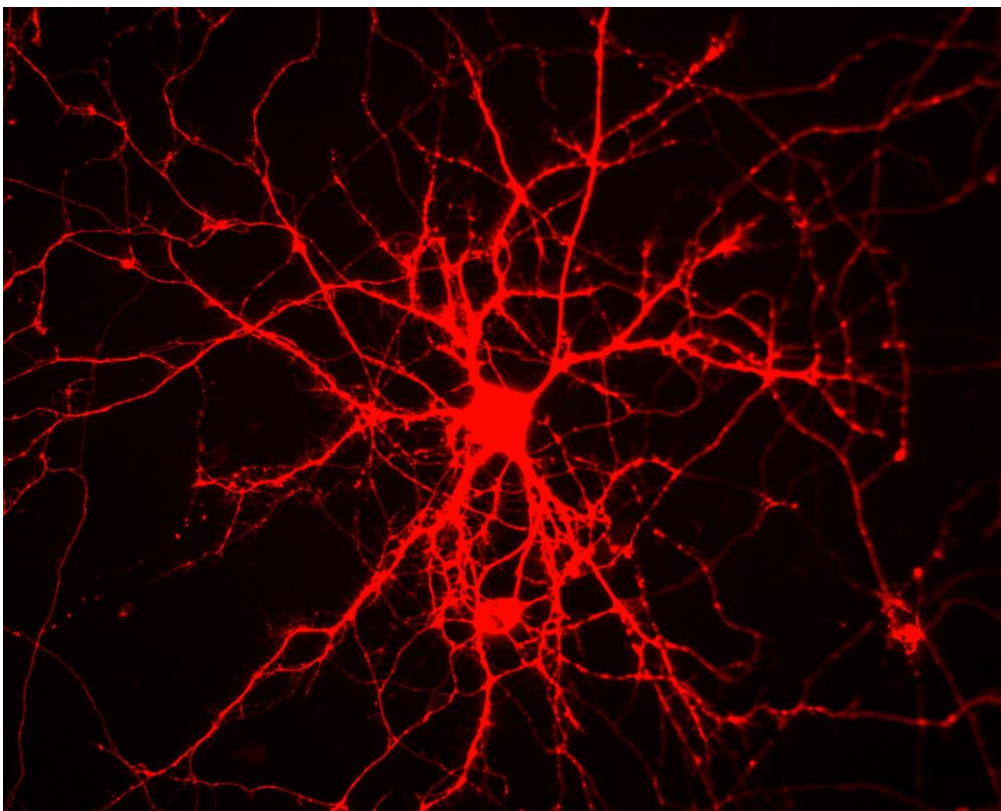
Durante o período de 6 meses de desenvolvimento do projeto na Alemanha, foi possível a construção dos vetores virais expressando *Syt1*, cuja sequência foi confirmada através de sequenciamento. Além disso, a confirmação da capacidade infecciosa dos vírus foi verificada em culturas de neurônios primários, conforme visualizado nas imagens capturadas através do microscópio invertido (**Figura 10**).

No entanto, devido a complicações técnicas, não obtivemos um número de replicatas experimentais com qualidade suficiente para a análise da morfologia dendrítica. Não foi possível repetir o experimento dentro prazo previsto e dessa forma, para obtermos os resultados, o experimento deverá ser realizado novamente para viabilizar as análises da morfologia dendrítica nas diferentes condições previstas.

A continuidade desse projeto está planejada para ter início a partir de março, momento em que um colaborador irá iniciar suas atividades no *Laboratory of Translational Psychiatry* com um projeto que prevê a utilização dos vetores virais AAV-Syt1. Conforme prevê o projeto original, a cultura de neurônios primários será realizada novamente, com infecção pelos vetores virais AAV-Syt1 já construídos e tratamento com MPH. No entanto, pequenas modificações no desenho experimental podem ser feitas por se tratar de um projeto que poderá ser desenvolvido em um período de tempo mais longo, como por exemplo, testar a indução do silenciamento do gene *Syt1* e iniciar um tratamento crônico com MPH nas células ao invés da dose única prevista. Após a aquisição das imagens dos neurônios, a análise das mesmas será realizada no Brasil com supervisão à distância do Dr. Florian Freudenberg. A análise das imagens prevê a avaliação das árvores dendríticas, que será realizada através do software *Simple Neurite Tracer* (Longair et al. 2011), com a utilização de *plug-ins* que permitam a condução de *Sholl analysis* (Ferreira et al. 2014) através do software *ImageJ/Fiji* (Schindelin et al. 2012).



**Figura 9.** Neurônio de hipocampo controle positivo para imunofluorescência eGFP.



**Figura 10.** Neurônio de hipocampo infectado com o vetor viral expressando *Syt1* (fluorescência positiva para mCherry).



## **CAPÍTULO VIII**

---

Discussão geral

Como mencionado na introdução, o TDAH é percebido como uma característica fenotípica relevante, com relatos há mais de dois mil anos, sendo que o tratamento com MPH é utilizado como primeira escolha há décadas. Assim, apesar de o diagnóstico do TDAH ser muitas vezes questionado e entendido como uma consequência de aspectos culturais e sociais recentes, ele é apoiado por relatos variados e muito antigos. Deve ser reconhecido, no entanto, que esse debate gera um impacto positivo no aumento do interesse científico pela busca de abordagens preventivas e terapêuticas cada vez mais eficazes. Para alcançar o sucesso na elucidação dessas questões, as abordagens mais promissoras envolvem pesquisas interdisciplinares, utilizando o modelo translacional, ou seja, “do leito à bancada e da bancada de volta ao leito”, do inglês *from bedside to bench and back*, permitindo assim, a troca bidirecional de conhecimento entre a ciência básica molecular e a clínica psiquiátrica. Nesse contexto, os dados obtidos durante a realização dessa Tese de Doutorado permitiram explorar as bases biológicas do uso de MPH, através da utilização de diferentes abordagens metodológicas sob uma perspectiva translacional, fornecendo um importante conjunto de informações que pode auxiliar na compreensão dos mecanismos biológicos subjacentes ao tratamento e servir como base para guiar estudos futuros.

O TDAH representa um problema com relevante impacto social e econômico quando não tratado adequadamente, pois está associado a desfechos adversos que causam prejuízos importantes para a qualidade de vida do indivíduo afetado, tendo implicações negativas nos contextos social, acadêmico e/ou profissional. Considerando que uma grande proporção de pacientes não apresenta resposta satisfatória com o uso de MPH, que é o medicamento de primeira escolha, faz-se necessária a identificação de fatores atuantes na variabilidade observada. Além disso, os estudos realizados até o momento não foram capazes de esclarecer completamente os mecanismos envolvidos na ampla gama de ações farmacológicas apresentadas pelo MPH. Ainda, a escassez de resultados significativos em estudos farmacogenéticos realizados em amostras de adultos com TDAH e a baixa sobreposição com os achados em crianças impulsionam a busca de novos genes e vias candidatas a serem explorados.

Os avanços alcançados na compreensão da neurobiologia do TDAH auxiliam na elucidação dos efeitos moleculares dos medicamentos utilizados para seu tratamento e possíveis fatores envolvidos com a resposta terapêutica e vice-versa. Nesse sentido, os

estudos de associação genética, de expressão gênica/proteica, e de função molecular realizados até o momento sugerem que diversas rotas biológicas estão implicadas no TDAH, além das amplamente estudadas vias de DA e NE. Da mesma forma, está claro que alterações apenas nessas vias não são suficientes para explicar todos os efeitos farmacológicos do tratamento. Por exemplo, muitas das ações do MPH demonstraram ser independentes do DAT, que é o principal alvo terapêutico desse medicamento (Volz et al. 2007; Federici et al. 2014). Além disso, o envolvimento de outros neurotransmissores, como a serotonina, o GABA e o glutamato, foi demonstrado tanto para a fisiopatologia do TDAH quanto para os efeitos do MPH (Moore et al. 2006; Edden et al. 2012; Bollmann et al. 2015; Bauer et al. 2016; Cheng et al. 2017; Wang et al. 2018b). Infelizmente, os achados ainda não são suficientes para apontar inferências claras de causa-efeito sobre as relações entre as alterações observadas em todos esses sistemas, e de que forma eles interagem para modular as funções prejudicadas no TDAH. Considerando que a exocitose é um processo comum para a neurotransmissão de vários sistemas, é plausível sugerir que alterações na atividade dessa rota possam gerar um impacto mais abrangente sobre diferentes vias de neurotransmissores, as quais claramente dependem desse processo de exocitose para um adequado funcionamento.

Essa hipótese é apoiada por evidências resultantes de estudos experimentais, de associação e *in silico* apontando o envolvimento das vias de liberação de neurotransmissores tanto na neurobiologia do TDAH quanto nas ações do MPH. Por exemplo, uma revisão de estudos farmacogenéticos de adultos com TDAH realizada pelo nosso grupo explorou ferramentas de bioinformática baseadas em bancos de dados de sistêmica para apontar redes e interações de proteínas possivelmente implicadas na resposta terapêutica ao MPH (Rovaris et al. 2014). Uma das redes reveladas envolve componentes do complexo SNARE, que é o principal mediador da exocitose de neurotransmissores. Além disso, conforme discutido em outro artigo de revisão conduzido pelo nosso grupo (Cupertino et al. 2016, ver capítulo IX - item 9.1.1), abordagens de gene candidato têm revelado associações de diversos polimorfismos em genes do complexo SNARE e seus componentes regulatórios com transtornos psiquiátricos, bem como com sua resposta terapêutica, principalmente em relação ao TDAH (Cupertino et al. 2016). Conforme mencionado no capítulo I dessa Tese, estudos experimentais também apoiam efeitos do MPH sobre a transmissão sináptica mediada por vesículas, em que o MPH foi

capaz de aumentar o transporte e liberação de DA (Volz et al. 2007), e modular expressão de genes do complexo SNARE (Bartl et al. 2010; Zhou et al. 2019).

Essas evidências foram usadas como base para os artigos apresentados nos capítulos III e IV, que incluem as abordagens de gene candidato e genômica. O primeiro (capítulo III) poderia ser contextualizado como o epílogo de uma era pré-genômica, complementando estudos anteriores do grupo envolvendo polimorfismos em genes candidatos relacionados ao complexo SNARE e o TDAH. O segundo (capítulo IV) marca o início das atividades do grupo com abordagens genômicas, contando então com dados de varredura genômica para avaliar o efeito combinado de variantes relacionadas às vias de liberação de neurotransmissores, através de análises de *gene-sets*.

### **8.1. Abordagem de gene-candidato**

A publicação do artigo contido no capítulo III em uma revista de grande relevância na área se deve em grande parte, obviamente além do interesse no resultado, também à extensa caracterização fenotípica da amostra. Vale destacar principalmente a abrangência dos dados de tratamento, que contam com informações de um seguimento de 7 anos. Além disso, o tamanho amostral do estudo (433 indivíduos com dados de persistência no uso do medicamento, sendo 111 acessados novamente após 7 anos, e 272 com dados de resposta terapêutica), apesar de relativamente pequeno, é ainda um dos maiores no mundo que inclui diferentes desfechos e questionários padronizados para a avaliação da resposta ao tratamento com MPH. Assim, foi possível detectar uma das poucas associações já publicadas para a farmacogenética do TDAH em adultos. Apenas duas associações prévias já tinham sido relatadas na literatura conforme apresentado na Tabela 1 do capítulo I dessa Tese. A primeira associação encontrada foi para o VNTR na região 3' do gene *DAT1*, em um estudo considerado exploratório que não aplicou correção para múltiplos testes e contou com uma amostra de 42 indivíduos (Kooij et al. 2008). O segundo estudo incluiu uma amostra maior, com 564 indivíduos, e avaliou um total de 20 polimorfismos (Hegvik et al. 2016) sem, no entanto, apresentar nenhum resultado significativo após correção para comparações múltiplas. Por outro lado, o nosso estudo aponta uma associação robusta do polimorfismo *SYT1*-rs2251214 com uma série de desfechos relacionados ao tratamento com MPH, incluindo a resposta sintomatológica, persistência no seguimento em curto e longo prazo e motivos para interrupção do tratamento. Esses resultados corroboram a nossa

hipótese sobre o envolvimento de componentes relacionados à excitose sobre os efeitos terapêuticos do MPH, considerando que o gene *SYT1* codifica uma proteína regulatória do complexo SNARE. Ainda assim, devemos considerar que o tamanho amostral pode ser um fator limitante para a detecção de associações de variantes com pequeno tamanho de efeito. Dessa forma, não podemos descartar a possibilidade de resultados falso-negativos para os outros polimorfismos avaliados nesse estudo (*STX1A*-rs2228607, *VAMP2*-26bp Ins/Del, and *SYT1*-rs1880867), especialmente para o *SYT1*-rs1880867 que demonstrou uma tendência de associação com o desfecho categórico de resposta ao MPH.

Em relação ao polimorfismo associado à resposta ao MPH no nosso estudo (*SYT1*-rs2251214), um artigo que avaliou uma amostra de adultos com TDAH provenientes da Espanha encontrou uma associação com o TDAH (Sánchez-Mora et al. 2013). Esses resultados foram replicados na nossa amostra de brasileiros adultos de descendência europeia em um estudo prévio do nosso grupo (Cupertino et al. 2017; capítulo IX - item 9.1.2), que além da associação com TDAH, demonstrou efeitos desse polimorfismo sobre características externalizantes, incluindo transtorno da personalidade antissocial e gravidade dos sintomas de transtorno de oposição desafiante (Cupertino et al. 2017). Essas associações, em conjunto com os dados incluídos nesta Tese, sugerem um possível *background* genético compartilhado entre esses fenótipos, em que o mesmo genótipo de risco para esses transtornos também foi associado à pior resposta e à descontinuidade do tratamento com MPH. Outra observação interessante é que fenótipos externalizantes, como os transtornos de personalidade, são considerados preditores de um pior prognóstico do curso e tratamento do TDAH (Robison et al. 2010; Olsen et al. 2012). Dessa forma, a associação encontrada para a interrupção precoce do tratamento também pode sugerir a possibilidade de um papel importante da *SYT1* para fenótipos externalizantes. Como resultados complementares a essas observações, os nossos achados envolvendo o *SYT1*-rs2251214 e a susceptibilidade ao transtorno por uso de cocaína, outro estimulante que compartilha alvos moleculares com o MPH, também corroboram a existência de um *background* genético compartilhado entre esses fenótipos (capítulo VI).

Além dos achados provenientes de estudos de gene candidato, mais recentemente esse gene também já foi associado a outros desfechos relacionados a fenótipos psiquiátricos por métodos de varredura genômica, tanto utilizando métodos *gene-based* (que avalia o efeito combinado de todos os SNPs do gene) quanto na avaliação individual

dos SNPs. Um GWAS utilizando a amostra do UK Biobank revelou uma associação do gene *SYTI* com o fenótipo neuroticismo, avaliado através do questionário de personalidade Eysenck (EPQ-R-S, *Eysenck Personality Questionnaire-Revised Short Form*) (Luciano et al. 2018). Outro GWAS, que também utilizou a amostra do UK Biobank para avaliar características de neuroticismo, apontou a associação especificamente do item de irritabilidade do questionário EPQ-R-S com o gene *SYTI* (Nagel et al. 2018). Além disso, o gene *SYTI* foi associado com anos de estudo e desempenho cognitivo (Lee et al. 2018). Alguns SNPs individuais também apresentam associações significativas nos GWAS acima mencionados, como o rs7963801 com desempenho cognitivo, o rs11113428 com irritabilidade e o rs1245829 com anos de estudo. No entanto, nenhum deles está em desequilíbrio de ligação com o rs2251214 aqui estudado e previamente associado nos estudos de gene candidato. Isso é intrigante considerando o envolvimento desse polimorfismo com vários fenótipos relacionados e desperta o interesse para o entendimento dos seus efeitos em nível molecular. No entanto, não conseguimos identificar um papel funcional para o polimorfismo, o que limita interpretações adicionais dos mecanismos por trás dessas associações. Assim, na presente Tese passamos a utilizar metodologias mais abrangentes na tentativa de compreender melhor o papel da via de excitose de neurotransmissores como um todo.

## **8.2. Abordagem genômica (análises de *gene-sets* definidos a priori)**

Na psiquiatria em geral, as abordagens genômicas têm sido de grande importância para a identificação de novos genes candidatos a serem investigados. Normalmente elas são realizadas por meio de consórcios internacionais, pois exigem um grande tamanho amostral para que seja possível a detecção associações. No entanto, essa ainda não é uma realidade quando se trata de desfechos envolvendo o tratamento, principalmente para o TDAH, para o qual apenas um estudo farmacogenômico foi realizado até o momento em uma pequena amostra de crianças (n=187) (Mick et al. 2008). Poucos GWAS foram conduzidos para outros medicamentos, como lítio, antipsicóticos e antidepressivos e, devido ao tamanho relativamente pequeno das amostras, mesmo contando com amostras colaborativas entre consórcios, nenhum ou poucos SNPs individuais com nível de significância genômica são encontrados entre os estudos (Uher et al. 2013; Hou et al. 2016; Brandl et al. 2016; Li et al. 2018). O nosso grupo faz parte de um consórcio internacional,

o IMpACT (*Internacional Multicentre Persistent ADHD ColaboraTion*), o qual está incluído em outro consórcio maior, o PGC, que envolve o estudo dos principais transtornos psiquiátricos. Essa colaboração viabilizou a genotipagem por varredura genômica da nossa amostra através do microarranjo *Psych Chip* realizada do *Broad Institute*. Ainda assim, até o presente momento, não foi possível a formação de uma colaboração que permita a avaliação conjunta das amostras dos diferentes grupos participantes desse consórcio em relação ao tratamento do TDAH. Isso ocorre porque além de os dados de tratamento para a maioria dessas amostras serem escassos e incluírem apenas uma pequena parcela da amostra total, existe uma alta heterogeneidade de desfechos avaliados nos diferentes grupos de pesquisa.

Assim, o artigo apresentado no capítulo IV utilizou os dados de varredura genômica, porém através de uma abordagem que apresenta maior poder estatístico para detectar associações. Esse estudo também foi baseado na hipótese da influência da liberação de neurotransmissores sobre a resposta ao MPH, e utiliza um método que consiste na avaliação do efeito combinado de variantes envolvidas nas vias biológicas (ou *gene-sets*) de interesse definidas *a priori*. A abordagem utilizada é especialmente vantajosa para estudos que contam com tamanho amostral insuficiente para a realização de uma análise de GWAS tradicional, a qual avalia o efeito individual de todos os SNPs genotipados pelo microarranjo, e portanto, requer uma correção muito rigorosa. Dessa forma, com o intuito de ampliar os achados da *SYT1* em relação à resposta ao MPH e buscar evidências adicionais que apoiem a hipótese do envolvimento de vias relacionadas à liberação de neurotransmissores, *gene-sets* representando essas vias foram escolhidos para serem testados. Os resultados dessas análises sugerem que a via de exocitose de neurotransmissores parece estar envolvida, pelo menos em parte, na variabilidade da resposta ao tratamento com MPH, já que, dos 9 *gene-sets* testados, 2 deles apresentaram associação nominal com o desfecho. No entanto, as análises *post-hoc* de controle de qualidade para avaliar a confiabilidade das associações, através da interpretação dos QQ-plots, não sustenta uma forte contribuição da maior parte dos genes dentro de cada *gene-set* em relação ao desfecho. Os padrões encontrados são sugestivos de que uma pequena proporção de genes pode ser responsável pelas associações, mas também é importante considerar que com o pequeno tamanho amostral seria pouco provável a identificação de associações mais robustas e as análises são consideradas preliminares. De qualquer forma,

esses resultados são sugestivos e devem ser replicados em amostras maiores, podendo ser considerados relevantes, pois são baseados em hipóteses que apresentam plausibilidade biológica.

Corroborando esses achados, vários GWAS avaliando desfechos psiquiátricos também demonstram associações de genes/polimorfismos nessas vias, além das já mencionadas para a *SYT1*. Por exemplo, o gene *TSNARE1*, envolvido na formação do complexo SNARE e fusão das vesículas, foi associado a distúrbios do sono (Hammerschlag et al. 2017) e esquizofrenia (Ripke et al. 2014). O *STXBP5-AS1*, envolvido na regulação da expressão do *STXBP5*, o qual também participa na formação do complexo SNARE, já foi associado ao TDAH (Arias-Vásquez et al. 2019). Outro gene importante para a liberação de neurotransmissores, a *STX1B*, possivelmente envolvida na ancoragem de vesículas sinápticas que precedem a exocitose, foi associada ao neuroticismo na amostra do UK Biobank (Luciano et al. 2018).

### **8.3. Abordagem integrativa proteômica-genômica**

Para complementar a abordagem translacional proposta na Tese, buscamos avaliar os efeitos do MPH sobre a expressão global de proteínas em tecido cerebral de ratos com o intuito de confirmar hipóteses, bem como revelar novas suposições sobre assinaturas moleculares envolvidas nas ações do MPH. A concretização desse estudo, apresentado no capítulo V, foi possível através da colaboração com pesquisadores nacionais e com o *Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute*, La Jolla, CA. Vale ressaltar que, embora o MPH seja utilizado na psiquiatria há mais de 50 anos, esse é o primeiro estudo a avaliar o perfil proteômico em resposta ao medicamento.

Os resultados obtidos com a análise proteômica revelaram diversas proteínas diferencialmente expressas com o tratamento com MPH, sendo que para a grande maioria delas, o MPH induziu a redução da expressão. Na tentativa de explorar o contexto biológico em que as proteínas diferencialmente expressas se inserem e melhor interpretar os resultados obtidos, foi realizada adicionalmente uma análise funcional de enriquecimento dessas proteínas. O grupo de proteínas que apresentou expressão reduzida em ratos tratados com MPH revelou vias previamente implicadas no TDAH e ações do MPH, bem como algumas relações pouco estudadas. As mais promissoras no contexto de processos biológicos são as vias relacionadas ao ciclo da liberação e transporte de



neurotransmissores. É importante destacar que partindo da utilização de uma abordagem livre de hipóteses também foi possível corroborar as proposições que basearam os estudos de associação apresentados nessa Tese. Na verdade, uma das vias geradas a partir da análise de proteômica (o *gene-set* “Reactome Neurotransmitter release cycle”) já havia sido selecionada para ser testada no artigo apresentado no capítulo IV como parte da nossa hipótese definida *a priori* para a resposta ao tratamento com MPH.

Além disso, com o objetivo de identificar quais vias, dentre aquelas provenientes da análise proteômica, seriam capazes de influenciar também a resposta terapêutica, a metodologia das análises de *gene-sets* utilizadas no artigo do capítulo IV foi aplicada novamente na nossa amostra clínica de adultos com TDAH. A diferença é que ao invés de hipóteses *a priori* baseadas em achados prévios do grupo e da literatura, nessa análise, os *gene-sets* testados partiram do enriquecimento funcional das proteínas diferencialmente expressas com o tratamento com MPH, ou seja, os *gene-sets* propostos surgiram de uma abordagem que originalmente era livre de hipóteses. Além do *gene-set* “Reactome Neurotransmitter release cycle”, que já havia demonstrado uma associação com a resposta terapêutica ao MPH, a outra associação encontrada envolve o ciclo de GABA. Nos últimos anos, alterações no sistema GABAérgico em pacientes com TDAH, e após o tratamento com MPH têm sido demonstradas. É interessante mencionar também que existem evidências de interações entre componentes dos sistemas GABAérgico e de liberação de neurotransmissores. Por exemplo, o transportador de GABA GAT1 interage com a STX1A resultando na diminuição da taxa de transporte do neurotransmissor. Esses achados, juntamente com os resultados de outros estudos demonstrando que a STX1A também interage com o DAT (Lee et al. 2004), sugerem uma relação regulatória entre os processos de liberação e recaptação de neurotransmissores (Deken et al. 2000).

Sendo esse o primeiro estudo a investigar os efeitos do MPH utilizando a abordagem proteômica, devemos reconhecer que há ainda muito a ser explorado nessa área. Por exemplo, é importante que nossos resultados sejam replicados em modelos animais que representem a sintomatologia e neurobiologia do TDAH, o que certamente será de grande utilidade para a interpretação dos resultados no contexto da condição patológica. Nesse sentido, o projeto apresentado no capítulo VII – item 7.1, que está em andamento, prevê a utilização dessa abordagem proteômica em um modelo animal para o TDAH.

Além disso, considerando as limitações da utilização de modelos animais, os quais não representam completamente a situação em humanos, e a dificuldade da realização de estudos para as medidas diretas no tecido cerebral *post-mortem* de humanos, outra abordagem promissora é a avaliação do perfil proteico no plasma de pacientes. Para outros medicamentos, como os antipsicóticos, a análise do perfil proteico no plasma de pacientes com esquizofrenia classificados em respondedores e não respondedores foi capaz de identificar vias biológicas moduladas pelas ações farmacológicas desse medicamento (Martins-De-Souza et al. 2015). Outro exemplo de sucesso da utilização da proteômica na área da psiquiatria envolve estudos independentes do perfil proteico no cérebro, no líquido cefalorraquidiano e em tecidos periféricos de pacientes com esquizofrenia, os quais revelaram consistentemente níveis menores da apolipoproteína A nesses indivíduos quando comparados aos controles, sugerindo que essa proteína provavelmente está implicada nos mecanismos subjacentes à doença (Huang et al. 2008). Dessa forma, espera-se que abordagens proteômicas possam ser úteis na identificação de biomarcadores para o TDAH e seu tratamento. Esse conhecimento pode ser agregado aos dados dos estudos de associação para promover um maior entendimento sobre as bases biológicas do transtorno.

#### **8.4. Considerações finais**

Através da utilização de múltiplas abordagens, integradas e complementares, o conjunto geral de resultados sugere que a variabilidade genética em vias de excitação de neurotransmissores influencia a resposta ao MPH, o qual, por sua vez, modula a expressão de proteínas desse sistema. Esse conjunto de evidências, somado a achados prévios, do envolvimento de uma via biológica por diferentes perspectivas é singular no contexto da psiquiatria. O principal objetivo em longo prazo de estudos envolvendo a identificação de fatores moduladores da resposta ao tratamento é a utilização desses preditores na prática clínica, com o intuito de personalizar o tratamento e desenvolver novas abordagens terapêuticas. No entanto, eles já constituem por si próprios um passo significativo no entendimento das bases biológicas do TDAH e do seu tratamento. O esclarecimento dos mecanismos biológicos tanto para os profissionais da saúde quanto para os pacientes representa sabidamente um reforço significativo na motivação para a busca do tratamento e sua aderência, além de contribuir para os esforços que visam à desmistificação do problema e universalização do tratamento.

Além disso, a expectativa é que os dados gerados aqui impulsionem investigações complementares capazes de caracterizar os mecanismos moleculares por trás dos diferentes efeitos farmacológicos observados para o MPH. Os estudos com modelos celulares *in vitro*, muitas vezes utilizando a tecnologia CRISPR/CAS9 ou abordagens utilizadas há mais tempo, como as apresentadas no projeto complementar dessa Tese (capítulo VII- item 7.2), são promissoras nesse sentido. Em paralelo aos estudos de funcionalidade molecular, as associações genéticas devem ser replicadas em amostras independentes, o que depende em grande parte de um esforço dos diferentes grupos de pesquisa para o aumento dos tamanhos amostrais dos estudos farmacogenéticos, principalmente em adultos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alawam K (2014) Application of proteomics in diagnosis of ADHD, schizophrenia, major depression, and suicidal behavior, 1st ed. Adv Protein Chem Struct Biol. doi: 10.1016/B978-0-12-800453-1.00009-9
- Andrews GD and Lavin A (2006) Methylphenidate increases cortical excitability via activation of alpha-2 noradrenergic receptors. *Neuropsychopharmacology* 31:594–601.
- APA (2013) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5®). American Psychiatric Pub
- Arai A, Tomiyama M, Kannari K, Kimura T, Suzuki C, Watanabe M, Kawarabayashi T, Shen H and Shoji M (2008) Reuptake of L-DOPA-derived extracellular DA in the striatum of a rodent model of Parkinson's disease via norepinephrine transporter. *Synapse* 62:632–635.
- Arcos-Burgos M, Vélez JI, Solomon BD and Muenke M (2012) A common genetic network underlies substance use disorders and disruptive or externalizing disorders. *Hum Genet* 131:917–29.
- Arias-Vásquez A, Groffen AJ, Spijker S, Ouwens KG, Klein M, Vojinovic D, Galesloot TE, Bralten J, Hottenga JJ, van der Most PJ et al. (2019) A Potential Role for the STXP5-AS1 Gene in Adult ADHD Symptoms. *Behav Genet*. doi: 10.1007/s10519-018-09947-2
- Arnsten AF and Dudley AG (2005) Methylphenidate improves prefrontal cortical cognitive function through alpha2 adrenoceptor and dopamine D1 receptor actions: Relevance to therapeutic effects in Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Behav Brain Funct* 1:2.
- Arnsten AFT (2007) Catecholamine and Second Messenger Influences on Prefrontal Cortical Networks of "Representational Knowledge": A Rational Bridge between Genetics and the Symptoms of Mental Illness. *Cereb Cortex* 17:i6–i15.
- Arnsten AFT and Pliszka SR (2011) Pharmacology, Biochemistry and Behavior Catecholamine influences on prefrontal cortical function: Relevance to treatment of attention deficit / hyperactivity disorder and related disorders ☆. *Pharmacol Biochem Behav* 99:211–216.
- Barkley RA (2018) Attention-deficit hyperactivity disorder: a handbook for diagnosis and treatment. Guilford Press
- Bartl J, Link P, Schlosser C, Gerlach M, Schmitt A, Walitza S, Riederer P and Grünblatt E (2010) Effects of methylphenidate: The cellular point of view. *ADHD Atten Deficit Hyperact Disord* 2:225–232.
- Bauer J, Werner A, Kohl W, Kugel H, Shushakova A, Pedersen A and Ohrmann P (2016) Hyperactivity and impulsivity in adult attention-deficit/hyperactivity disorder is related to glutamatergic dysfunction in the anterior cingulate cortex. *World J Biol Psychiatry* 1–9.
- Beaudoin GMJ, Lee S-H, Singh D, Yuan Y, Ng Y-G, Reichardt LF and Arikath J (2012) Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. *Nat Protoc* 7:1741–1754.

- Bernardinelli Y, Nikonenko I and Muller D (2014) Structural plasticity: mechanisms and contribution to developmental psychiatric disorders. *Front Neuroanat* 8:123.
- Berridge CW, Devilbiss DM, Andrzejewski ME, Arnsten AFT, 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* 60:1111–20.
- Biederman J, Faraone S V., Keenan K, Knee D and Tsuang MT (1990) Family-Genetic and Psychosocial Risk Factors in DSM-III Attention Deficit Disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 29:526–533.
- Biederman J, Faraone S V, Keenan K, Benjamin J, Krifcher B, Moore C, Sprich-Buckminster S, Ugaglia K, Jellinek MS and Steingard R (1992) Further evidence for family-genetic risk factors in attention deficit hyperactivity disorder. Patterns of comorbidity in probands and relatives psychiatrically and pediatrically referred samples. *Arch Gen Psychiatry* 49:728–38.
- Biederman J, Faraone S V, Mick E, Spencer T, Wilens T, Kiely K, Guite J, Ablon JS, Reed E and Warburton R (1995) High risk for attention deficit hyperactivity disorder among children of parents with childhood onset of the disorder: a pilot study. *Am J Psychiatry* 152:431–435.
- Biederman J, Mick E and Faraone S V (2000) Age-dependent decline of symptoms of attention deficit hyperactivity disorder: impact of remission definition and symptom type. *Am J Psychiatry* 157:816–8.
- Biederman J, Petty CR, Evans M, Small J and Faraone S V (2010) How persistent is ADHD? A controlled 10-year follow-up study of boys with ADHD. *Psychiatry Res* 177:299–304.
- Biederman J, Petty CR, Fried R, Kaiser R, Dolan CR, Schoenfeld S, Doyle AE, Seidman LJ and Faraone S V (2008) Educational and occupational underattainment in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: a controlled study. *J Clin Psychiatry* 69:1217–22.
- Biederman J and Spencer T (1999) Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) as a noradrenergic disorder. *Biol Psychiatry* 46:1234–42.
- Bolea-Alamañac B, Nutt DJ, Adamou M, Asherson P, Bazire S, Coghill D, Heal D, Müller U, Nash J, Santosh P et al. (2014) Evidence-based guidelines for the pharmacological management of attention deficit hyperactivity disorder: Update on recommendations from the British Association for Psychopharmacology. *J Psychopharmacol* 28:179–203.
- Bollmann S, Ghisleni C, Poil S-S, Martin E, Ball J, Eich-Höchli D, Edden RAE, Klaver P, Michels L, Brandeis D et al. (2015) Developmental changes in gamma-aminobutyric acid levels in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Transl Psychiatry* 5:e589–e589.
- Bonvicini C, Faraone S V and Scassellati C (2016) Attention-deficit hyperactivity disorder in adults: A systematic review and meta-analysis of genetic, pharmacogenetic and biochemical studies. *Mol Psychiatry* 21:872–84.

Bosch PJ, Peng L and Kivell BM (2015) Proteomics analysis of dorsal striatum reveals changes in synaptosomal proteins following methamphetamine self-administration in rats. *PLoS One* 10:1–17.

Bourne J and Harris KM (2007) Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr Opin Neurobiol* 17:381–386.

Brainstorm Consortium. Anttila V, Bulik-Sullivan B, Finucane HK, Walters RK, Bras J, Duncan L, Escott-Price V, Falcone GJ, Gormley P, Malik R et al. (2018) Analysis of shared heritability in common disorders of the brain. *Science* (80- ) 360:eaap8757.

Brandl EJ, Tiwari AK, Zai CC, Nurmi EL, Chowdhury NI, Arenovich T, Sanches M, Goncalves VF, Shen JJ, Lieberman JA et al. (2016) Genome-wide association study on antipsychotic-induced weight gain in the CATIE sample. *Pharmacogenomics J* 16:352–356.

Brinkmalm A, Brinkmalm G, Honer WG, Frölich L, Hausner L, Minthon L, Hansson O, Wallin A, Zetterberg H, Blennow K et al. (2014) SNAP-25 is a promising novel cerebrospinal fluid biomarker for synapse degeneration in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 9:53.

Britton GB (2012) Cognitive and emotional behavioural changes associated with methylphenidate treatment: a review of preclinical studies. *Int J Neuropsychopharmacol* 15:41–53.

Brown RW, Hughes BA, Hughes AB, Sheppard AB, Perna MK, Ragsdale WL, Roeding RL and Pond BB (2012) Sex and dose-related differences in methylphenidate adolescent locomotor sensitization and effects on brain-derived neurotrophic factor. *J Psychopharmacol* 26:1480–1488.

Cairncross M and Miller CJ (2016) The Effectiveness of Mindfulness-Based Therapies for ADHD. *J Atten Disord* 108705471562530.

Candemir E, Kollert L, Weißflog L, Geis M, Müller A, Post AM, O'Leary A, Harro J, Reif A and Freudenberg F (2016) Interaction of NOS1AP with the NOS-I PDZ domain: Implications for schizophrenia-related alterations in dendritic morphology. *Eur Neuropsychopharmacol* 26:741–755.

Cantwell DP (1972) Psychiatric illness in the families of hyperactive children. *Arch Gen Psychiatry* 27:414–7.

Cao C and Moulton J (2014) GWAS and drug targets. *BMC Genomics* 15 Suppl 4:S5.

Carey MP, Diewald LM, Esposito FJ, Pellicano MP, Gironi Carnevale UA, Sergeant JA, Papa M and Sadile AG (1998) Differential distribution, affinity and plasticity of dopamine D-1 and D-2 receptors in the target sites of the mesolimbic system in an animal model of ADHD. *Behav Brain Res* 94:173–85.

Castells X, Ramos-Quiroga JA, Rigau D, Bosch R, Nogueira M, Vidal X and Casas M (2011) Efficacy of methylphenidate for adults with attention-deficit hyperactivity disorder: a meta-regression analysis. *CNS Drugs* 25:157–69.

- Catalá-López F, Hutton B, Núñez-Beltrán A, Page MJ, Ridao M, Macías Saint-Gerons D, Catalá MA, Tabarés-Seisdedos R and Moher D (2017) The pharmacological and non-pharmacological treatment of attention deficit hyperactivity disorder in children and adolescents: A systematic review with network meta-analyses of randomised trials. *PLoS One* 12:e0180355.
- Caye A, Spadini A V., Karam RG, Grevet EH, Rovaris DL, Bau CHD, Rohde LA and Kieling C (2016) Predictors of persistence of ADHD into adulthood: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 25:1151–1159.
- Chang Z, Lichtenstein P, Asherson PJ and Larsson H (2013) Developmental twin study of attention problems: high heritabilities throughout development. *JAMA psychiatry* 70:311–8.
- Chang Z, Lichtenstein P, D’Onofrio BM, Sjölander A and Larsson H (2014) Serious transport accidents in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder and the effect of medication: a population-based study. *JAMA psychiatry* 71:319–25.
- Cheng J, Liu A, Shi MY and Yan Z (2017) Disrupted Glutamatergic Transmission in Prefrontal Cortex Contributes to Behavioral Abnormality in an Animal Model of ADHD. *Neuropsychopharmacology* 42:2096–2104.
- Cheng J, Xiong Z, Duffney LJ, Wei J, Liu A, Liu S, Chen G-J and Yan Z (2014) Methylphenidate exerts dose-dependent effects on glutamate receptors and behaviors. *Biol Psychiatry* 76:953–62.
- Contini V, Rovaris DL, Victor MM, Grevet EH, Rohde LA and Bau CHD (2013) Pharmacogenetics of response to methylphenidate in adult patients with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD): A systematic review. *Eur Neuropsychopharmacol* 23:555–560.
- Contini V, Victor MM, Bertuzzi GP, Salgado CAI, Picon FA, Grevet EH, Rohde LA, Belmonte-de-Abreu P and Bau CHD (2012) No significant association between genetic variants in 7 candidate genes and response to methylphenidate treatment in adult patients with ADHD. *J Clin Psychopharmacol* 32:820–3.
- Contini V, Victor MM, Cerqueira CCS, Polina ER, Grevet EH, Salgado CAI, Karam RG, Vitola ES, Belmonte-de-Abreu P and Bau CHD (2011) Adrenergic  $\alpha$ 2A receptor gene is not associated with methylphenidate response in adults with ADHD. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 261:205–11.
- Contini V, Victor MM, Marques FZC, Bertuzzi GP, Salgado CAI, Silva KL, Sousa NO, Grevet EH, Belmonte-de-Abreu P and Bau CHD (2010) Response to methylphenidate is not influenced by DAT1 polymorphisms in a sample of Brazilian adult patients with ADHD. *J Neural Transm* 117:269–76.
- Cortese S, Adamo N, Giovane D, Mohr-Jensen C, Hayes AJ, Carucci S, Atkinson LZ, Tessari L, Banaschewski T, Coghill D et al. (2018) Comparative efficacy and tolerability of medications for attention-deficit hyperactivity disorder in children, adolescents, and adults: a systematic review and network meta-analysis. [www.thelancet.com/psychiatry](http://www.thelancet.com/psychiatry). doi: 10.1016/S2215-0366(18)30269-4

- Crabbe JC, Jarvik LF, Liston EH and Jenden DJ (1983) Behavioral responses to amphetamines in identical twins. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)* 32:139–49.
- Cupertino RB, Kappel DB, Bandeira CE, Schuch JB, da Silva BS, Müller D, Bau CHD and Mota NR (2016) SNARE complex in developmental psychiatry: neurotransmitter exocytosis and beyond. *J Neural Transm* 123:867–83.
- Cupertino RB, Schuch JB, Bandeira CE, da Silva BS, Rovaris DL, Kappel DB, Contini V, Salatino-Oliveira A, Vitola ES, Karam RG et al. (2017) Replicated association of Synaptotagmin (SYT1) with ADHD and its broader influence in externalizing behaviors. *Eur Neuropsychopharmacol*. doi: 10.1016/j.euroneuro.2017.01.007
- Czerniak SM, Sikoglu EM, King JA, Kennedy DN, Mick E, Frazier J and Moore CM (2013) Areas of the brain modulated by single-dose methylphenidate treatment in youth with ADHD during task-based fMRI: a systematic review. *Harv Rev Psychiatry* 21:151–62.
- da Silva BS, Cupertino RB, Rovaris DL, Schuch JB, Kappel DB, Müller D, Bandeira CE, Victor MM, Karam RG, Mota NR et al. (2018) Exocytosis-related genes and response to methylphenidate treatment in adults with ADHD. *Mol Psychiatry* 23:1446–1452.
- Dalsgaard S, Mortensen PB, Frydenberg M and Thomsen PH (2014) ADHD, stimulant treatment in childhood and subsequent substance abuse in adulthood - a naturalistic long-term follow-up study. *Addict Behav* 39:325–8.
- Dalsgaard S, Østergaard SD, Leckman JF, Mortensen PB and Pedersen MG (2015) Mortality in children, adolescents, and adults with attention deficit hyperactivity disorder: a nationwide cohort study. *Lancet* 385:2190–2196.
- De Crescenzo F, Cortese S, Adamo N and Janiri L (2017) Pharmacological and non-pharmacological treatment of adults with ADHD: a meta-review. *Evid Based Ment Heal* 20:4–11.
- de Leeuw CA, Mooij JM, Heskes T and Posthuma D (2015) MAGMA: generalized gene-set analysis of GWAS data. *PLoS Comput Biol* 11:e1004219.
- de Villiers AS, Russell VA, Sagvolden T, Searson A, Jaffer A and Taljaard JJ (1995) Alpha 2-adrenoceptor mediated inhibition of [3H]dopamine release from nucleus accumbens slices and monoamine levels in a rat model for attention-deficit hyperactivity disorder. *Neurochem Res* 20:427–33.
- Deken SL, Beckman ML, Boos L and Quick MW (2000) Transport rates of GABA transporters: regulation by the N-terminal domain and syntaxin 1A. *Nat Neurosci* 3:998–1003.
- del Campo N, Chamberlain SR, Sahakian BJ and Robbins TW (2011) The Roles of Dopamine and Noradrenaline in the Pathophysiology and Treatment of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Biol Psychiatry* 69:e145–e157.
- Demontis D, Walters RK, Martin J, Mattheisen M, Als TD, Agerbo E, Baldursson G, Belliveau R, Bybjerg-Grauholm J, Bækvad-Hansen M et al. (2019) Discovery of the first



genome-wide significant risk loci for attention deficit/hyperactivity disorder. *Nat Genet* 51:63–75.

Dittner AJ, Hodson J, Rimes KA, Russell AJ and Chalder T (2018) Cognitive-behavioural therapy for adult attention-deficit hyperactivity disorder: a proof of concept randomised controlled trial. *Acta Psychiatr Scand* 137:125–137.

Dommett EJ, Henderson EL, Westwell MS and Greenfield SA (2008) Methylphenidate amplifies long-term plasticity in the hippocampus via noradrenergic mechanisms. *Learn Mem* 15:580–586.

Ebejer JL, Duffy DL, van der Werf J, Wright MJ, Montgomery G, Gillespie NA, Hickie IB, Martin NG and Medland SE (2013) Genome-wide association study of inattention and hyperactivity-impulsivity measured as quantitative traits. *Twin Res Hum Genet* 16:560–74.

Edden RAE, Crocetti D, Zhu H, Gilbert DL and Mostofsky SH (2012) Reduced GABA Concentration in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Arch Gen Psychiatry* 69:750–3.

Eilertsen EM, Gjerde LC, Reichborn-Kjennerud T, Ørstavik RE, Knudsen GP, Stoltenberg C, Czajkowski N, Røysamb E, Kendler KS and Ystrom E (2017) Maternal alcohol use during pregnancy and offspring attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD): a prospective sibling control study. *Int J Epidemiol* 46:1633–1640.

Faraj BA, Israili ZH, Perel JM, Jenkins ML, Holtzman SG, Cucinell SA and Dayton PG (1974) Metabolism and disposition of methylphenidate-14C: studies in man and animals. *J Pharmacol Exp Ther* 191:535–47.

Faraone S V. and Biederman J (2002) Pathophysiology of attention-deficit/hyperactivity disorder. In: *Neuropsychopharmacology – 5th Generation of Progress*. Digital library

Faraone S V., Bonvicini C and Scassellati C (2014) Biomarkers in the Diagnosis of ADHD – Promising Directions. *Curr Psychiatry Rep* 16:497.

Faraone S V. and Larsson H (2019) Genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 24:562–575.

Faraone S V. and Mick E (2010) Molecular Genetics of Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Psychiatr Clin North Am* 33:159–180.

Faraone S V, Biederman J and Mick E (2006) The age-dependent decline of attention deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis of follow-up studies. *Psychol Med* 36:159–65.

Faraone S V, Perlis RH, Doyle AE, Smoller JW, Goralnick JJ, Holmgren MA and Sklar P (2005) Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57:1313–23.

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

Federici M, Latagliata EC, Ledonne A, Rizzo FR, Feligioni M, Sulzer D, Dunn M, Sames

- D, Gu H, Nisticò R et al. (2014) Paradoxical abatement of striatal dopaminergic transmission by cocaine and methylphenidate. *J Biol Chem* 289:264–74.
- Fernández-Castillo N, Cormand B, Roncero C, Sánchez-Mora C, Grau-Lopez L, Gonzalvo B, Miquel L, Corominas R, Ramos-Quiroga JA, Casas M et al. (2012) Candidate pathway association study in cocaine dependence: the control of neurotransmitter release. *World J Biol Psychiatry* 13:126–34.
- Ferreira TA, Blackman A V, Oyrer J, Jayabal S, Chung AJ, Watt AJ, Sjöström PJ and van Meyel DJ (2014) Neuronal morphometry directly from bitmap images. *Nat Methods* 11:982–984.
- Fliers EA, Vasquez AA, Poelmans G, Rommelse N, Altink M, Buschgens C, Asherson P, Banaschewski T, Ebstein R, Gill M et al. (2012) Genome-wide association study of motor coordination problems in ADHD identifies genes for brain and muscle function. *World J Biol Psychiatry* 13:211–22.
- Forrest MP, Parnell E and Penzes P (2018) Dendritic structural plasticity and neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci* 19:215–234.
- Franz AP, Bolat GU, Bolat H, Matijasevich A, Santos IS, Silveira RC, Procianoy RS, Rohde LA and Moreira-Maia CR (2018) Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Very Preterm/Very Low Birth Weight: A Meta-analysis. *Pediatrics* 141:e20171645.
- Frodl T and Skokauskas N (2012) Meta-analysis of structural MRI studies in children and adults with attention deficit hyperactivity disorder indicates treatment effects. *Acta Psychiatr Scand* 125:114–126.
- Froehlich TE, Anixt JS, Loe IM, Chirdkiatgumchai V, Kuan L and Gilman RC (2011) Update on environmental risk factors for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Curr Psychiatry Rep* 13:333–44.
- Gajria K, Lu M, Sikirica V, Greven P, Zhong Y, Qin P and Xie J (2014) Adherence, persistence, and medication discontinuation in patients with attention-deficit/hyperactivity disorder - a systematic literature review. *Neuropsychiatr Dis Treat* 10:1543–69.
- Gamo NJ, Wang M and Arnsten AFT (2010) Methylphenidate and atomoxetine enhance prefrontal function through  $\alpha$ 2-adrenergic and dopamine D1 receptors. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 49:1011–23.
- Garner AA, O'connor BC, Narad ME, Tamm L, Simon J and Epstein JN (2013) The relationship between ADHD symptom dimensions, clinical correlates, and functional impairments. *J Dev Behav Pediatr* 34:469–77.
- Gizer IR, Ficks C and Waldman ID (2009) Candidate gene studies of ADHD: A meta-analytic review. *Hum Genet* 126:51–90.
- Greif KF, Asabere N, Lutz GJ and Gallo G (2013) Synaptotagmin-1 promotes the formation of axonal filopodia and branches along the developing axons of forebrain neurons. *Dev Neurobiol*. doi: 10.1002/dneu.22033
- Gronier B (2011) In vivo electrophysiological effects of methylphenidate in the prefrontal

cortex: involvement of dopamine D1 and alpha 2 adrenergic receptors. *Eur Neuropsychopharmacol* 21:192–204.

Guiard BP, El Mansari M, Merali Z and Blier P (2008) Functional interactions between dopamine, serotonin and norepinephrine neurons: an in-vivo electrophysiological study in rats with monoaminergic lesions. *Int J Neuropsychopharmacol* 11:625–639.

Hammerschlag AR, Stringer S, de Leeuw CA, Sniekers S, Taskesen E, Watanabe K, Blanken TF, Dekker K, te Lindert BHW, Wassing R et al. (2017) Genome-wide association analysis of insomnia complaints identifies risk genes and genetic overlap with psychiatric and metabolic traits. *Nat Genet* 49:1584–1592.

Hannestad J, Gallezot J-D, Planeta-Wilson B, Lin S-F, Williams WA, van Dyck CH, Malison RT, Carson RE and Ding Y-S (2010) Clinically relevant doses of methylphenidate significantly occupy norepinephrine transporters in humans in vivo. *Biol Psychiatry* 68:854–60.

Heal DJ, Gosden J and Smith SL (2014) Dopamine reuptake transporter (DAT) &quot;inverse agonism&quot;--a novel hypothesis to explain the enigmatic pharmacology of cocaine. *Neuropharmacology* 87:19–40.

Hegvik T-A, Jacobsen KK, Fredriksen M, Zayats T and Haavik J (2016) A candidate gene investigation of methylphenidate response in adult attention-deficit/hyperactivity disorder patients: results from a naturalistic study. *J Neural Transm* 123:859–65.

Hinney A, Scherag A, Jarick I, Albayrak Ö, Pütter C, Pechlivanis S, Dauvermann MR, Beck S, Weber H, Scherag S et al. (2011) Genome-wide association study in German patients with attention deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 156B:888–97.

Hirano M, Rakwal R, Shibato J, Sawa H, Nagashima K, Ogawa Y, Yoshida Y, Iwahashi H, Niki E and Masuo Y (2008) Proteomics- and transcriptomics-based screening of differentially expressed proteins and genes in brain of wig rat: A model for attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) research. *J Proteome Res* 7:2471–2489.

Hoogman M, Bralten J, Hibar DP, Mennes M, Zwiers MP, Schweren LSJ, van Hulzen KJE, Medland SE, Shumskaya E, Jahanshad N et al. (2017) Subcortical brain volume differences in participants with attention deficit hyperactivity disorder in children and adults: a cross-sectional mega-analysis. *The Lancet Psychiatry* 4:310–319.

Horn JL, Janicki PK and Franks JJ (1995) Diminished brain synaptic plasma membrane Ca(2+)-ATPase activity in spontaneously hypertensive rats: association with reduced anesthetic requirements. *Life Sci* 56:PL427-32.

Hou L, Heilbronner U, Degenhardt F, Adli M, Akiyama K, Akula N, Ardaur R, Arias B, Backlund L, Banzato CEM et al. (2016) Genetic variants associated with response to lithium treatment in bipolar disorder: a genome-wide association study. *Lancet (London, England)* 387:1085–1093.

Hou Y, Xiong P, Gu X, Huang X, Wang M and Wu J (2018) Association of Serotonin Receptors with Attention Deficit Hyperactivity Disorder: A Systematic Review and Meta-

analysis. *Curr Med Sci* 38:538–551.

Huang JT-J, Wang L, Prabakaran S, Wengenroth M, Lockstone HE, Koethe D, Gerth CW, Gross S, Schreiber D, Lilley K et al. (2008) Independent protein-profiling studies show a decrease in apolipoprotein A1 levels in schizophrenia CSF, brain and peripheral tissues. *Mol Psychiatry* 13:1118–1128.

Husson I, Mesplès B, Medja F, Leroux P, Kosofsky B and Gressens P (2004) Methylphenidate and MK-801, an N-methyl-d-aspartate receptor antagonist: shared biological properties. *Neuroscience* 125:163–70.

Inoue Y, Kamikubo Y, Ezure H, Ito J, Kato Y, Moriyama H and Otsuka N (2015) Presynaptic protein Synaptotagmin1 regulates the neuronal polarity and axon differentiation in cultured hippocampal neurons. *BMC Neurosci*. doi: 10.1186/s12868-015-0231-x

Jensen CM, Amdisen BL, Jørgensen KJ and Arnfred SMH (2016) Cognitive behavioural therapy for ADHD in adults: systematic review and meta-analyses. *ADHD Atten Deficit Hyperact Disord* 8:3–11.

Jensen CM and Steinhausen H-C (2015) Comorbid mental disorders in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder in a large nationwide study. *ADHD Atten Deficit Hyperact Disord* 7:27–38.

Jenson D, Yang K, Acevedo-Rodriguez A, Levine A, Broussard JI, Tang J and Dani JA (2015) Dopamine and norepinephrine receptors participate in methylphenidate enhancement of in vivo hippocampal synaptic plasticity. *Neuropharmacology* 90:23–32.

Johnston C and Mash EJ (2001) Families of children with attention-deficit/hyperactivity disorder: review and recommendations for future research. *Clin Child Fam Psychol Rev* 4:183–207.

Karam RG, Breda V, Picon FA, Rovaris DL, Victor MM, Salgado CAI, Vitola ES, Silva KL, Guimarães-da-Silva PO, Mota NR et al. (2015) Persistence and remission of ADHD during adulthood: a 7-year clinical follow-up study. *Psychol Med* 45:2045–56.

Katzman MA, Bilkey TS, Chokka PR, Fallu A and Klassen LJ (2017) Adult ADHD and comorbid disorders: clinical implications of a dimensional approach. *BMC Psychiatry* 17:302.

Kavalali ET (2015) The mechanisms and functions of spontaneous neurotransmitter release. *Nat Rev Neurosci* 16:5–16.

Kendler KS, Gardner C, JACOBSON KC, NEALE MC and PRESCOTT CA (2005) Genetic and environmental influences on illicit drug use and tobacco use across birth cohorts. *Psychol Med* 35:1349.

Kessler RC, Adler L, Barkley R, Biederman J, Conners CK, Demler O, Faraone S V., Greenhill LL, Howes MJ, Secnik K et al. (2006) The Prevalence and Correlates of Adult ADHD in the United States: Results From the National Comorbidity Survey Replication. *Am J Psychiatry* 163:716–723.

- Kim JW, Kim B-N, Kim JI, Lee YS, Min KJ, Kim H-J and Lee J (2015) Social Network Analysis Reveals the Negative Effects of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) Symptoms on Friend-Based Student Networks. *PLoS One* 10:e0142782.
- Kim Y, Teylan MA, Baron M, Sands A, Nairn AC and Greengard P (2009) Methylphenidate-induced dendritic spine formation and DeltaFosB expression in nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:2915–20.
- Koda K, Ago Y, Cong Y, Kita Y, Takuma K and Matsuda T (2010) Effects of acute and chronic administration of atomoxetine and methylphenidate on extracellular levels of noradrenaline, dopamine and serotonin in the prefrontal cortex and striatum of mice. *J Neurochem* 114:no-no.
- Kooij JS, Boonstra AM, Vermeulen SH, Heister AG, Burger H, Buitelaar JK and Franke B (2008) Response to methylphenidate in adults with ADHD is associated with a polymorphism in SLC6A3 (DAT1). *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 147:201–208.
- Kooij SJ, Bejerot S, Blackwell A, Caci H, Casas-Brugué M, Carpentier PJ, Edvinsson D, Fayyad J, Foeken K, Fitzgerald M et al. (2010) European consensus statement on diagnosis and treatment of adult ADHD: The European Network Adult ADHD. *BMC Psychiatry* 10:67.
- Kuczenski R and Segal DS (2002) Exposure of adolescent rats to oral methylphenidate: preferential effects on extracellular norepinephrine and absence of sensitization and cross-sensitization to methamphetamine. *J Neurosci* 22:7264–71.
- Lai CSL, Gerrelli D, Monaco AP, Fisher SE and Copp AJ (2003) FOXP2 expression during brain development coincides with adult sites of pathology in a severe speech and language disorder. *Brain* 126:2455–2462.
- Lange KW, Reichl S, Lange KM, Tucha L and Tucha O (2010) The history of attention deficit hyperactivity disorder. *Atten Defic Hyperact Disord* 2:241–55.
- Larsson H, Chang Z, D’Onofrio BM and Lichtenstein P (2014) The heritability of clinically diagnosed attention deficit hyperactivity disorder across the lifespan. *Psychol Med* 44:2223–2229.
- Lasky-Su J, Anney RJL, Neale BM, Franke B, Zhou K, Maller JB, Vasquez AA, Chen W, Asherson P, Buitelaar J et al. (2008a) Genome-wide association scan of the time to onset of attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B:1355–8.
- Lasky-Su J, Neale BM, Franke B, Anney RJL, Zhou K, Maller JB, Vasquez AA, Chen W, Asherson P, Buitelaar J et al. (2008b) Genome-wide association scan of quantitative traits for attention deficit hyperactivity disorder identifies novel associations and confirms candidate gene associations. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B:1345–54.
- Lee JJ, Wedow R, Okbay A, Kong E, Maghziyan O, Zacher M, Nguyen-Viet TA, Bowers P, Sidorenko J, Karlsson Linnér R et al. (2018) Gene discovery and polygenic prediction from a genome-wide association study of educational attainment in 1.1 million individuals.

Nat Genet 50:1112–1121.

Lee K-H, Kim M-Y, Kim D-H and Lee Y-S (2004) Syntaxin 1A and receptor for activated C kinase interact with the N-terminal region of human dopamine transporter. *Neurochem Res* 29:1405–9.

Lee Y, Yang H-J, Chen VC, Lee W-T, Teng M-J, Lin C-H and Gossop M (2016) Meta-analysis of quality of life in children and adolescents with ADHD: By both parent proxy-report and child self-report using PedsQL™. *Res Dev Disabil* 51–52:160–172.

Lehohla M, Kellaway L and Russell VA (2004) NMDA receptor function in the prefrontal cortex of a rat model for attention-deficit hyperactivity disorder. *Metab Brain Dis* 19:35–42.

Lehohla M, Russell V and Kellaway L (2001) NMDA-stimulated Ca<sup>2+</sup> uptake into barrel cortex slices of spontaneously hypertensive rats. *Metab Brain Dis* 16:133–41.

Leuner B, Falduo J and Shors TJ (2003) Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *J Neurosci* 23:659–65.

Li J, Yoshikawa A, Brennan MD, Ramsey TL and Meltzer HY (2018) Genetic predictors of antipsychotic response to lurasidone identified in a genome wide association study and by schizophrenia risk genes. *Schizophr Res* 192:194–204.

Li Q, Lu G, Antonio GE, Mak YT, Rudd JA, Fan M and Yew DT (2007) The usefulness of the spontaneously hypertensive rat to model attention-deficit / hyperactivity disorder ( ADHD ) may be explained by the differential expression of dopamine-related genes in the brain. *50:848–857*.

Li Q, Wong JH, Lu G, Antonio GE, Yeung DK, Ng TB, Forster LE and Yew DT (2009) Gene expression of synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25) in the prefrontal cortex of the spontaneously hypertensive rat (SHR). *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1792:766–776.

Liddle EB, Hollis C, Batty MJ, Groom MJ, Totman JJ, Liotti M, Scerif G and Liddle PF (2011) Task-related default mode network modulation and inhibitory control in ADHD: effects of motivation and methylphenidate. *J Child Psychol Psychiatry* 52:761–771.

Liew Z, Ritz B, Rebordosa C, Lee P-C and Olsen J (2014) Acetaminophen Use During Pregnancy, Behavioral Problems, and Hyperkinetic Disorders. *JAMA Pediatr* 168:313.

Linthorst AC, van Giersbergen PL, Gras M, Versteeg DH and de Jong W (1994) The nigrostriatal dopamine system: role in the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res* 639:261–8.

Liu Y-S, Dai X, Wu W, Yuan F, Gu X, Chen J-G, Zhu L-Q and Wu J (2016) The Association of SNAP25 Gene Polymorphisms in Attention Deficit/Hyperactivity Disorder: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Mol Neurobiol*. doi: 10.1007/s12035-016-9810-9

Loe IM and Feldman HM (2007) Academic and Educational Outcomes of Children With ADHD. *J Pediatr Psychol* 32:643–654.

- Longair MH, Baker DA and Armstrong JD (2011) Simple Neurite Tracer: open source software for reconstruction, visualization and analysis of neuronal processes. *Bioinformatics* 27:2453–2454.
- Luciano M, Hagenaars SP, Davies G, Hill WD, Clarke T-K, Shirali M, Harris SE, Marioni RE, Liewald DC, Fawns-Ritchie C et al. (2018) Association analysis in over 329,000 individuals identifies 116 independent variants influencing neuroticism. *Nat Genet* 50:6–11.
- Maiya R, Ponomarev I, Linse KD, Harris RA and Mayfield RD (2007) Defining the dopamine transporter proteome by convergent biochemical and in silico analyses. *Genes, Brain Behav* 6:97–106.
- Markowitz JS and Patrick KS (2008) Differential Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Methylphenidate Enantiomers. *J Clin Psychopharmacol* 28:S54–S61.
- Martins-De-Souza D, Solari FA, Guest PC, Zahedi RP and Steiner J (2015) Biological pathways modulated by antipsychotics in the blood plasma of schizophrenia patients and their association to a clinical response. *Nat Publ Gr* 1:15050.
- McClure C, Cole KLH, Wulff P, Klugmann M and Murray AJ (2011) Production and Titering of Recombinant Adeno-associated Viral Vectors. *J Vis Exp* e3348.
- Mick E, Biederman J, Spencer T, Faraone S V and Sklar P (2006) Absence of association with DAT1 polymorphism and response to methylphenidate in a sample of adults with ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141B:890–4.
- Mick E, Neale B, Middleton FA, McGough JJ and Faraone S V (2008) Genome-wide association study of response to methylphenidate in 187 children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B:1412–8.
- Mick E, Todorov A, Smalley S, Hu X, Loo S, Todd RD, Biederman J, Byrne D, Dechairo B, Guiney A et al. (2010) Family-based genome-wide association scan of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 49:898–905.e3.
- Middeldorp CM, Hammerschlag AR, Ouwens KG, Groen-Blokhuis MM, St. Pourcain B, Greven CU, Pappa I, Tiesler CMT, Ang W, Nolte IM et al. (2016) A Genome-Wide Association Meta-Analysis of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Symptoms in Population-Based Pediatric Cohorts. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 55:896–905.e6.
- Mill J, Sagvolden T and Asherson P (2005) Sequence analysis of Drd2, Drd4, and Dat1 in SHR and WKY rat strains. *Behav Brain Funct* 1:24.
- Miller EM, Pomerleau F, Huettl P, Russell VA, Gerhardt GA and Glaser PEA (2012) The spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rat models of ADHD exhibit sub-regional differences in dopamine release and uptake in the striatum and nucleus accumbens. *Neuropharmacology* 63:1327–34.
- Miller EM, Thomas TC, Gerhardt GA and Glaser PEA (2013) Dopamine and Glutamate Interactions in ADHD: Implications for the Future Neuropharmacology of ADHD. *Atten*

Deficit Hyperact Disord Child Adolesc 109–138.

Modi NB, Lindemulder B and Gupta SK (2000) Single- and multiple-dose pharmacokinetics of an oral once-a-day osmotic controlled-release OROS (methylphenidate HCl) formulation. *J Clin Pharmacol* 40:379–88.

Mohr-Jensen C and Steinhausen H-C (2016) A meta-analysis and systematic review of the risks associated with childhood attention-deficit hyperactivity disorder on long-term outcome of arrests, convictions, and incarcerations. *Clin Psychol Rev* 48:32–42.

Mooney MA, McWeeney SK, Faraone S V., Hinney A, Hebebrand J, Nigg JT, Wilmot B, Nigg JT and Wilmot B (2016) Pathway analysis in attention deficit hyperactivity disorder: An ensemble approach. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 171:815–826.

Moore CM, Biederman J, Wozniak J, Mick E, Aleardi M, Wardrop M, Dougherty M, Harpold T, Hammerness P, Randall E et al. (2006) Differences in Brain Chemistry in Children and Adolescents With Attention Deficit Hyperactivity Disorder With and Without Comorbid Bipolar Disorder: A Proton Magnetic Resonance Spectroscopy Study. *Am J Psychiatry* 163:316–318.

Morón JA, Brockington A, Wise RA, Rocha BA and 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* 22:389–95.

Morrison JR and Stewart MA (1971) A family study of the hyperactive child syndrome. *Biol Psychiatry* 3:189–95.

Morton WA and Stockton GG (2000) Methylphenidate Abuse and Psychiatric Side Effects. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry* 2:159–164.

Mostert JC, Onnink AMH, Klein M, Dammers J, Harneit A, Schulten T, van Hulzen KJE, Kan CC, Slaats-Willems D, Buitelaar JK et al. (2015) Cognitive heterogeneity in adult attention deficit/hyperactivity disorder: A systematic analysis of neuropsychological measurements. *Eur Neuropsychopharmacol* 25:2062–2074.

Myer NM, Boland JR and Faraone S V (2017) Pharmacogenetics predictors of methylphenidate efficacy in childhood ADHD. *Mol Psychiatry*. doi: 10.1038/mp.2017.234

Nagel M, Watanabe K, Stringer S, Posthuma D and van der Sluis S (2018) Item-level analyses reveal genetic heterogeneity in neuroticism. *Nat Commun* 9:905.

Nakao T, Radua J, Rubia K and Mataix-Cols D (2011) Gray Matter Volume Abnormalities in ADHD: Voxel-Based Meta-Analysis Exploring the Effects of Age and Stimulant Medication. *Am J Psychiatry* 168:1154–1163.

Neale B, Medland S, Ripke S, Anney RJL, Asherson P, Buitelaar J, Franke B, Gill M, Kent L, Holmans P et al. (2010a) Case-control genome-wide association study of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am ...* 49:906–920.

Neale B, Medland S, Ripke S, Asherson P, Franke B, Lesch K, Faraone S, Nguyen T, Schafer H and Holmans P (2010b) Meta-analysis of genome-wide association studies of attention deficit /hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 49:884–897.



Neale BM, Medland S, Ripke S, Anney RJL, Asherson P, Buitelaar J, Franke B, Gill M, Kent L, Holmans P et al. (2010c) Case-control genome-wide association study of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 49:906–20.

Neale BM, Su J, Anney R, Franke B, Maller JB, Vasquez AA, Asherson P, Chen W, Buitelaar J, Ebstein R et al. (2008) Genome-wide Association Scan of Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B:1337–1344.

NICE guideline (2018) National Institute for Health and Care Excellence (NICE). Attention deficit hyperactivity disorder: diagnosis and management NICE guidelines [NG87]. [nice.org.uk/guidance/ng87](https://www.nice.org.uk/guidance/ng87). Accessed 22 Oct 2018

Nikolas MA, Marshall P and Hoelzle JB (2019) The role of neurocognitive tests in the assessment of adult attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychol Assess*. doi: 10.1037/pas0000688

Nurnberger JI, Gershon ES, Simmons S, Ebert M, Kessler LR, Dibble ED, Jimerson SS, Brown GM, Gold P, Jimerson DC et al. (1982) Behavioral, biochemical and neuroendocrine responses to amphetamine in normal twins and “well-state” bipolar patients. *Psychoneuroendocrinology* 7:163–76.

Öhrfelt A, Brinkmalm A, Dumurgier J, Brinkmalm G, Hansson O, Zetterberg H, Bouaziz-Amar E, Hugon J, Paquet C and Blennow K (2016) The pre-synaptic vesicle protein synaptotagmin is a novel biomarker for Alzheimer’s disease. *Alzheimers Res Ther* 8:41.

Olsen JL, Reimherr FW, Marchant BK, Wender PH and Robison RJ (2012) The effect of personality disorder symptoms on response to treatment with methylphenidate transdermal system in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Prim care companion CNS Disord*. doi: 10.4088/PCC.12m01344

Pagerols M, Richarte V, Sánchez-Mora C, Rovira P, Soler Artigas M, Garcia-Martínez I, Calvo-Sánchez E, Corrales M, da Silva BS, Mota NR et al. (2018) Integrative genomic analysis of methylphenidate response in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Sci Rep* 8:1881.

Pingali S and Sunderajan J (2014) A study of comorbidities in attention deficit hyperactivity disorder: a retrospective analysis of case records.

Polanczyk G, Lima MS de, Horta BL, Biederman J and Rohde LA (2007) The Worldwide Prevalence of ADHD : A Systematic Review and Metaregression Analysis Reproduced with permission of the copyright owner . Further reproduction prohibited without permission . 942–948.

Prince J (2008) Catecholamine Dysfunction in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *J Clin Psychopharmacol* 28:S39–S45.

Qiu S, Anderson CT, Levitt P and Shepherd GMG (2011) Circuit-specific intracortical hyperconnectivity in mice with deletion of the autism-associated Met receptor tyrosine kinase. *J Neurosci* 31:5855–64.

Quansah E, Sgamma T, Jaddoa E and Zetterström TSC (2017) Chronic methylphenidate

regulates genes and proteins mediating neuroplasticity in the juvenile rat brain. *Neurosci Lett* 654:93–98.

Querne L, Fall S, Le Moing A-G, Bourel-Ponchel E, Delignières A, Simonnot A, de Broca A, Gondry-Jouet C, Boucart M and Berquin P (2017) Effects of Methylphenidate on Default-Mode Network/Task-Positive Network Synchronization in Children With ADHD. *J Atten Disord* 21:1208–1220.

Reale L, Bartoli B, Cartabia M, Zanetti M, Costantino MA, Canevini MP, Termine C, Bonati M and Lombardy ADHD Group (2017) Comorbidity prevalence and treatment outcome in children and adolescents with ADHD. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 26:1443–1457.

Ribasés M, Sánchez-Mora C, Ramos-Quiroga JA, Bosch R, Gómez N, Nogueira M, Corrales M, Palomar G, Jacob CP, Gross-Lesch S et al. (2012) An association study of sequence variants in the forkhead box P2 (FOXP2) gene and adulthood attention-deficit/hyperactivity disorder in two European samples. *Psychiatr Genet* 22:155–160.

Riddle EL, Hanson GR and Fleckenstein AE (2007) Therapeutic doses of amphetamine and methylphenidate selectively redistribute the vesicular monoamine transporter-2. *Eur J Pharmacol* 571:25–8.

Ripke S, Neale BM, Corvin A, Walters JTR, Farh K-H, Holmans PA, Lee P, Bulik-Sullivan B, Collier DA, Huang H et al. (2014) Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* 511:421–7.

Risher WC, Ustunkaya T, Singh Alvarado J and Eroglu C (2014) Rapid Golgi Analysis Method for Efficient and Unbiased Classification of Dendritic Spines. *PLoS One* 9:e107591.

Rizo J (2018) Mechanism of neurotransmitter release coming into focus. *Protein Sci* 27:1364–1391.

Robison RJ, Reimherr FW, Gale PD, Marchant BK, Williams ED, Soni P, Halls C and Strong RE (2010) Personality disorders in ADHD Part 2: The effect of symptoms of personality disorder on response to treatment with OROS methylphenidate in adults with ADHD. *Ann Clin Psychiatry* 22:94–102.

Rovaris DL, Mota NR, da Silva BS, Girardi P, Victor MM, Grevet EH, Bau CH and Contini V (2014) Should we keep on? Looking into pharmacogenomics of ADHD in adulthood from a different perspective. *Pharmacogenomics* 15:1365–81.

Rozas C, Carvallo C, Contreras D, Carreño M, Ugarte G, Delgado R, Zeise ML and Morales B (2015) Methylphenidate amplifies long-term potentiation in rat hippocampus CA1 area involving the insertion of AMPA receptors by activation of  $\beta$ -adrenergic and D1/D5 receptors. *Neuropharmacology* 99:15–27.

Rubia K, Alegría AA and Brinson H (2014) Brain abnormalities in attention-deficit hyperactivity disorder: a review. *Rev Neurol* 58 Suppl 1:S3-16.

Ruiz-Goikoetxea M, Cortese S, Aznarez-Sanado M, Magallón S, Alvarez Zallo N, Luis

EO, de Castro-Manglano P, Soutullo C and Arrondo G (2018) Risk of unintentional injuries in children and adolescents with ADHD and the impact of ADHD medications: A systematic review and meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev* 84:63–71.

Russell VA (2011) Overview of Animal Models of Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD). *Curr Protoc Neurosci* 54:9.35.1-9.35.25.

Sagvolden T (2000) Behavioral validation of the spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (AD/HD). *Neurosci Biobehav Rev* 24:31–39.

Sagvolden T and Johansen EB (2012) Rat models of ADHD. *Curr Top Behav Neurosci* 9:301–15.

Sagvolden T, Johansen EB, Aase H and Russell VA (2005) A dynamic developmental theory of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) predominantly hyperactive/impulsive and combined subtypes. *Behav Brain Sci* 28:397-419; discussion 419–68.

Sánchez-Mora C, Cormand B, Ramos-Quiroga JA, Hervás A, Bosch R, Palomar G, Nogueira M, Gómez-Barros N, Richarte V, Corrales M et al. (2013) Evaluation of common variants in 16 genes involved in the regulation of neurotransmitter release in ADHD. *Eur Neuropsychopharmacol* 23:426–35.

Sánchez-Soto M, Bonifazi A, Cai NS, Ellenberger MP, Newman AH, Ferré S and Yano H (2016) Evidence for Noncanonical Neurotransmitter Activation: Norepinephrine as a Dopamine D2-Like Receptor Agonist. *Mol Pharmacol* 89:457–66.

Sandtorv LB, Fevang SKE, Nilsen SA, Bøe T, Gjestad R, Haugland S and Elgen IB (2018) Symptoms Associated With Attention Deficit/Hyperactivity Disorder and Autism Spectrum Disorders in School-Aged Children Prenatally Exposed to Substances. *Subst Abus Res Treat* 12:117822181876577.

Sarinana J, Kitamura T, Kunzler P, Sultzman L and Tonegawa S (2014) Differential roles of the dopamine 1-class receptors, D1R and D5R, in hippocampal dependent memory. *Proc Natl Acad Sci* 111:8245–8250.

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B et al. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676–682.

Schwab Y, Mouton J, Chasserot-Golaz S, Marty I, Maulet Y and Jover E (2001) Calcium-dependent translocation of synaptotagmin to the plasma membrane in the dendrites of developing neurones. *Brain Res Mol Brain Res* 96:1–13.

Schwarz R, Reif A, Scholz C-J, Weissflog L, Schmidt B, Lesch K-P, Jacob C, Reichert S, Heupel J, Volkert J et al. (2015) A preliminary study on methylphenidate-regulated gene expression in lymphoblastoid cells of ADHD patients. *World J Biol Psychiatry* 16:180–189.

Shaw M, Hodgkins P, Caci H, Young S, Kahle J, Woods AG and Arnold LE (2012) A

systematic review and analysis of long-term outcomes in attention deficit hyperactivity disorder: effects of treatment and non-treatment. *BMC Med* 10:99.

Shinohara R, Taniguchi M, Ehrlich AT, Yokogawa K, Deguchi Y, Cherasse Y, Lazarus M, Urade Y, Ogawa A, Kitaoka S et al. (2018) Dopamine D1 receptor subtype mediates acute stress-induced dendritic growth in excitatory neurons of the medial prefrontal cortex and contributes to suppression of stress susceptibility in mice. *Mol Psychiatry* 23:1717–1730.

Silveri MM, Sneider JT, Crowley DJ, Covell MJ, Acharya D, Rosso IM and Jensen JE (2013) Frontal Lobe  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Levels During Adolescence: Associations with Impulsivity and Response Inhibition. *Biol Psychiatry* 74:296–304.

Simchon Y, Weizman A and Rehavi M (2010) The effect of chronic methylphenidate administration on presynaptic dopaminergic parameters in a rat model for ADHD. *Eur Neuropsychopharmacol* 20:714–720.

Simon V, Czobor P, Balint S, Meszaros A and Bitter I (2009) Prevalence and correlates of adult Attention-Deficit Hyperactivity Disorder: meta-analysis. *Br J Psychiatry* 194:204–211.

Sobanski E, Retz W, Fischer R, Ose C, Alm B, Hennig O and Rösler M (2014) Treatment adherence and persistence in adult ADHD: Results from a twenty-four week controlled clinical trial with extended release methylphenidate. *Eur Psychiatry* 29:324–330.

Sokolowska I, Ngounou Wetie AG, Wormwood K, Thome J and Darie C. (2015) The potential of biomarkers in psychiatry: focus on proteomics. *J Neural Transm* 122:9–18.

Spencer RC, Devilbiss DM and Berridge CW (2015) The Cognition-Enhancing Effects of Psychostimulants Involve Direct Action in the Prefrontal Cortex. *Biol Psychiatry* 77:940–950.

Spencer T, Biederman J, Wilens T, Harding M, Donnell DO and Griffin S (1996) Pharmacotherapy of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder across the Life Cycle. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 35:409–432.

Spencer TJ, Brown A, Seidman LJ, Valera EM, Makris N, Lomedico A, Faraone S V. and Biederman J (2013) Effect of Psychostimulants on Brain Structure and Function in ADHD. *J Clin Psychiatry* 74:902–917.

Srinivas NR, Hubbard JW, Korchinski ED and Midha KK (1993) Enantioselective pharmacokinetics of dl-threo-methylphenidate in humans. *Pharm Res* 10:14–21.

Steinhausen H-C (2009) The heterogeneity of causes and courses of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Acta Psychiatr Scand* 120:392–399.

Stergiakouli E, Hamshere M, Holmans P, Langley K, Zaharieva I, Hawi Z, Kent L, Gill M, Williams N, Owen MJ et al. (2012) Investigating the contribution of common genetic variants to the risk and pathogenesis of ADHD. *Am J Psychiatry* 169:186–94.

Südhof TC (2013) Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron* 80:675–90.

Sutton MA and Schuman EM (2006) Dendritic Protein Synthesis, Synaptic Plasticity, and Memory. *Cell* 127:49–58.

Takamatsu Y, Hagino Y, Sato A, Takahashi T, Nagasawa SY, Kubo Y, Mizuguchi M, Uhl GR, Sora I and Ikeda K (2015) Improvement of learning and increase in dopamine level in the frontal cortex by methylphenidate in mice lacking dopamine transporter. *Curr Mol Med* 15:245–52.

Tamminga HGH, Reneman L, Huizenga HM and Geurts HM (2016) Effects of methylphenidate on executive functioning in attention-deficit/hyperactivity disorder across the lifespan: a meta-regression analysis. *Psychol Med* 46:1791–1807.

Thome J, Ehlis A-C, Fallgatter AJ, Krauel K, Lange KW, Riederer P, Romanos M, Taurines R, Tucha O, Uzbekov M et al. (2012) Biomarkers for attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). A consensus report of the WFSBP task force on biological markers and the World Federation of ADHD. *World J Biol Psychiatry* 13:379–400.

Uher R, Tansey KE, Henigsberg N, Wolfgang M, Mors O, Hauser J, Placentino A, Souery D, Farmer A, Aitchison KJ et al. (2013) Common Genetic Variation and Antidepressant Efficacy in Major Depressive Disorder: A Meta-Analysis of Three Genome-Wide Pharmacogenetic Studies. *Am J Psychiatry* 170:207–217.

Upadhyaya HP (2008) Substance use disorders in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder: implications for treatment and the role of the primary care physician. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry* 10:211–21.

Urban KR, Li Y-C and Gao W-J (2013) Treatment with a clinically-relevant dose of methylphenidate alters NMDA receptor composition and synaptic plasticity in the juvenile rat prefrontal cortex. *Neurobiol Learn Mem* 101:65–74.

Van Waes V, Beverley J, Marinelli M and Steiner H (2010) Selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants potentiate methylphenidate (Ritalin)-induced gene regulation in the adolescent striatum. *Eur J Neurosci* 32:435–447.

Ventura R, Alcaro A and Puglisi-Allegra S (2005) Prefrontal cortical norepinephrine release is critical for morphine-induced reward, reinstatement and dopamine release in the nucleus accumbens. *Cereb Cortex* 15:1877–86.

Victor MM, da Silva BS, Kappel DB, Bau CH and Grevet EH (2018) Attention-deficit hyperactivity disorder in ancient Greece: The Obtuse Man of Theophrastus. *Aust New Zeal J Psychiatry* 52:509–513.

Victor MM, Grevet EH, Salgado CAI, Silva KL, Sousa NO, Karam RG, Vitola ES, Picon FA, Zeni GD, Contini V et al. (2009) Reasons for pretreatment attrition and dropout from methylphenidate in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: the role of comorbidities. *J Clin Psychopharmacol* 29:614–6.

Vijayraghavan S, Wang M, Birnbaum SG, Williams G V and Arnsten AFT (2007) Inverted-U dopamine D1 receptor actions on prefrontal neurons engaged in working memory. *Nat Neurosci* 10:376–384.

- Volkow ND, Fowler JS, Wang G, Ding Y and Gatley SJ (2002) Mechanism of action of methylphenidate: insights from PET imaging studies. *J Atten Disord* 6 Suppl 1:S31-43.
- Volz TJ, Farnsworth SJ, Hanson GR and Fleckenstein AE (2008) Methylphenidate-induced alterations in synaptic vesicle trafficking and activity. *Ann N Y Acad Sci* 1139:285–90.
- Volz TJ, Farnsworth SJ, King JL, Riddle EL, Hanson GR and Fleckenstein AE (2007) Methylphenidate Administration Alters Vesicular Monoamine Transporter-2 Function in Cytoplasmic and Membrane-Associated Vesicles. *J Neurosci* 27:738–745.
- Wang J, Yuan W and Li MD (2011) Genes and Pathways Co-associated with the Exposure to Multiple Drugs of Abuse, Including Alcohol, Amphetamine/Methamphetamine, Cocaine, Marijuana, Morphine, and/or Nicotine: a Review of Proteomics Analyses. *Mol Neurobiol* 1–18.
- Wang L-J, Yu Y-H, Fu M-L, Yeh W-T, Hsu J-L, Yang Y-H, Chen WJ, Chiang B-L and Pan W-H (2018a) Attention deficit–hyperactivity disorder is associated with allergic symptoms and low levels of hemoglobin and serotonin. *Sci Rep* 8:10229.
- Wang L-J, Yu Y-H, Fu M-L, Yeh W-T, Hsu J-L, Yang Y-H, Chen WJ, Chiang B-L and Pan W-H (2018b) Attention deficit–hyperactivity disorder is associated with allergic symptoms and low levels of hemoglobin and serotonin. *Sci Rep* 8:10229.
- Wenthur CJ (2016) Classics in Chemical Neuroscience: Methylphenidate. *ACS Chem Neurosci* 7:1030–1040.
- Wilens TE (2008) Effects of methylphenidate on the catecholaminergic system in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychopharmacol* 28:S46-53.
- Willcutt EG, Doyle AE, Nigg JT, Faraone S V. and Pennington BF (2005) Validity of the Executive Function Theory of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Meta-Analytic Review. *Biol Psychiatry* 57:1336–1346.
- Womersley JS, Dimatelis JJ and Russell VA (2015) Proteomic analysis of maternal separation-induced striatal changes in a rat model of ADHD: The spontaneously hypertensive rat. *J Neurosci Methods* 252:1–11.
- Xing B, Li Y-C and Gao W-J (2016) Norepinephrine versus dopamine and their interaction in modulating synaptic function in the prefrontal cortex. *Brain Res* 1641:217–33.
- Xu J, Pang ZP, Shin O-H and Südhof TC (2009) Synaptotagmin-1 functions as a Ca<sup>2+</sup> sensor for spontaneous release. *Nat Neurosci* 12:759–66.
- Yang L, Neale BM, Liu L, Lee SH, Wray NR, Ji N, Li H, Qian Q, Wang D, Li J et al. (2013) Polygenic transmission and complex neuro developmental network for attention deficit hyperactivity disorder: Genome-wide association study of both common and rare variants. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet*. doi: 10.1002/ajmg.b.32169
- Yang X, Morris SM, Gearhart JM, Ruark CD, Paule MG, Slikker W, Mattison DR, Vitiello B, Twaddle NC, Doerge DR et al. (2014) Development of a Physiologically Based Model to Describe the Pharmacokinetics of Methylphenidate in Juvenile and Adult Humans and

Nonhuman Primates. *PLoS One* 9:e106101.

Yang Y, Wang X, Frerking M and Zhou Q (2008) Spine expansion and stabilization associated with long-term potentiation. *J Neurosci* 28:5740–51.

Yano M and Steiner H (2005) Methylphenidate (Ritalin) induces Homer 1a and zif 268 expression in specific corticostriatal circuits. *Neuroscience* 132:855–865.

Zhang J, Luo W, Li Q, Xu R, Wang Q and Huang Q (2018) Peripheral brain-derived neurotrophic factor in attention-deficit/hyperactivity disorder: A comprehensive systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord* 227:298–304.

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

Zhou Q, Homma KJ and Poo M (2004) Shrinkage of Dendritic Spines Associated with Long-Term Depression of Hippocampal Synapses. *Neuron* 44:749–757.

Zhou R, Wang J, Han X, Ma B, Yuan H and Song Y (2019) Baicalin regulates the dopamine system to control the core symptoms of ADHD. *Mol Brain* 12:11.

Zimmer L (2017) Contribution of Clinical Neuroimaging to the Understanding of the Pharmacology of Methylphenidate. *Trends Pharmacol Sci* 38:608–620.

## **CAPÍTULO IX**

---

Produções científicas adicionais



## 9.1 Relacionadas ao tema da Tese

### 9.1.1. Artigo Publicado 1

J Neural Transm  
DOI 10.1007/s00702-016-1514-9



PSYCHIATRY AND PRECLINICAL PSYCHIATRIC STUDIES - REVIEW ARTICLE

## SNARE complex in developmental psychiatry: neurotransmitter exocytosis and beyond

Renata Basso Cupertino<sup>1</sup> · Djenifer B. Kappel<sup>1</sup> · Cibele Edom Bandeira<sup>1</sup> ·  
Jaqueline Bohrer Schuch<sup>1</sup> · Bruna Santos da Silva<sup>1</sup> · Diana Müller<sup>1</sup> ·  
Claiton Henrique Dotto Bau<sup>1</sup> · Nina Roth Mota<sup>1</sup>

Received: 23 September 2015 / Accepted: 20 January 2016  
© Springer-Verlag Wien 2016

**Abstract** Multiple biological processes throughout development require intracellular vesicular trafficking, where the SNARE (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein (SNAP) receptors) complex plays a major role. The core proteins forming the SNARE complex are SNAP-25 (synaptosomal-associated protein 25), VAMP (vesicle-associated membrane protein) and Syntaxins, besides its regulatory proteins, such as Synaptotagmin. Genes encoding these proteins (*SNAP25*, *VAMP1*, *VAMP2*, *STX1A*, *SYT1* and *SYT2*) have been studied in relation to psychiatric disorders susceptibility. Here, we review physiological aspects of SNARE complex and genetic association results reported for attention deficit hyperactivity disorder, both in children and adults, autism spectrum disorders, major depressive disorder, bipolar disorder and schizophrenia. Moreover, we included findings from expression, pharmacogenetics and animal model studies regarding these clinical phenotypes. The overall scenario depicted here suggests that the SNARE complex may exert distinct roles throughout development, with age-specific effects of genetic variants in psychiatric disorders. Such perspective should be considered in future studies regarding SNARE complex genes.

**Keywords** SNARE · Development · Psychiatry disorders · ADHD · DEVELOPM.PSYCH

### Introduction

SNARE (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein receptors) complex is a large family of proteins that plays a major role in intracellular vesicular trafficking in eukaryotic cells. Such process is essential in different biological events, such as cell division, maintenance of subcellular compartments, protein and hormone secretion and neurotransmitter release (Zylbersztejn and Galli 2011). The SNARE complex is formed by members of the SNAP-25 (Synaptosomal-Associated Protein 25), VAMP (Vesicle-Associated Membrane Protein) and Syntaxins families. These proteins interact creating a four-helix bundle, formed by two helices of SNAP-25, one vesicle-transmembrane VAMP and one presynaptic plasma membrane Syntaxin that approximates the vesicle and plasmatic membranes (Sutton et al. 1998; Brunger 2000) (Fig. 1). Other proteins interact with the SNARE complex and regulate it, such as Munc-18, Complexin, Synaptophysin and the better studied Syt (Synaptotagmin) (Südhof 2013).

According to cell tissue and developmental stage, distinct family members of SNARE complex present different expression profiles. SNAP-25 family members are characterized by the presence of two SNARE domains, which are the binding sites between SNAP-25 and VAMP and Syntaxin SNARE domains, in order to form the core SNARE complex. The most studied member of this protein family is SNAP-25, which is expressed in neurons and directly involved in neurotransmitter release. It is anchored to the presynaptic plasma membrane through palmitoylation of cysteine

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00702-016-1514-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

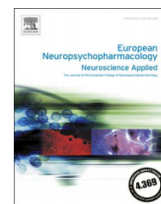
✉ Claiton Henrique Dotto Bau  
claiton.bau@ufrgs.br

<sup>1</sup> Department of Genetics, Instituto de Biociências—  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento  
Gonçalves, 9500, Porto Alegre, RS CEP 91501-970, Brazil



ELSEVIER

www.elsevier.com/locate/euroneuro



## Replicated association of Synaptotagmin (*SYT1*) with ADHD and its broader influence in externalizing behaviors

Renata Basso Cupertino<sup>a</sup>, Jaqueline Bohrer Schuch<sup>a</sup>,  
 Cibele Edom Bandeira<sup>a</sup>, Bruna Santos da Silva<sup>a</sup>,  
 Diego Luiz Rovaris<sup>a</sup>, Djenifer B. Kappel<sup>a</sup>, Verônica Contini<sup>b</sup>,  
 Angélica Salatino-Oliveira<sup>a</sup>, Eduardo Schneider Vitola<sup>c</sup>,  
 Rafael Gomes Karam<sup>d</sup>, Mara Helena Hutz<sup>a,d</sup>,  
 Luis Augusto Rohde<sup>c,d,e</sup>, Eugenio Horacio Grevet<sup>c,d</sup>,  
 Claiton Henrique Dotto Bau<sup>a,d,\*</sup>, Nina Roth Mota<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup>Department of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>b</sup>PPGBIOTEC - Postgraduate Program in Biotechnology, Centro Universitário Univates, Lajeado, Brazil

<sup>c</sup>Department of Psychiatry, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>d</sup>ADHD Outpatient Program, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>e</sup>National Institute of Developmental Psychiatry for Children and Adolescents, Brazil

Received 13 July 2016; received in revised form 30 October 2016; accepted 5 January 2017

### KEYWORDS

SNARE;  
 Attention-Deficit/  
 Hyperactivity Disorder;  
 Synaptotagmin;  
 ASPD;  
 Antisocial Personality  
 Disorder;  
 Meta-analysis

### Abstract

Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) is a common psychiatric disorder, affecting both children and adults. The Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment REceptors (SNARE) complex has been implicated in ADHD pathophysiology since it is a key component of neurotransmitter release events and neurodevelopment processes, and SNPs in this complex have been associated with ADHD. Here we aim to analyze the effects of SNARE complex variants on ADHD susceptibility and its clinical heterogeneity in affected adults. We tested the association between ADHD and polymorphisms on the SNARE genes *STX1A* (rs2228607), *SYT1* (rs1880867 and rs2251214), *VAMP2* (26bp Ins/Del) and *SNAP25* (rs6108461 and rs8636) on a sample comprised of 548 adults with ADHD and 644 non-affected controls. Regarding clinical heterogeneity, we further investigated the effects of associated SNPs on age at onset of

\*Correspondence to: Department of Genetics, Instituto de Biociências, UFRGS, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, RS, Brazil  
 CEP: 91501-970. Fax: +55 (51) 3308 7311.

E-mail address: claiton.bau@ufrgs.br (C.H.D. Bau).

<sup>1</sup>These authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2017.01.007>

0924-977X/© 2017 Elsevier B.V. and ECNP. All rights reserved.

Please cite this article as: Cupertino, R.B., et al., Replicated association of Synaptotagmin (*SYT1*) with ADHD and its broader influence in externalizing behaviors. *European Neuropsychopharmacology* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2017.01.007>

# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Integrative genomic analysis of methylphenidate response in attention-deficit/hyperactivity disorder

Received: 31 May 2017

Accepted: 15 January 2018

Published online: 30 January 2018

Mireia Pagerols<sup>1,2</sup>, Vanesa Richarte<sup>2,3,4</sup>, Cristina Sánchez-Mora<sup>1,2,3</sup>, Paula Rovira<sup>1,2</sup>, Maria Soler Artigas<sup>1,3</sup>, Iris Garcia-Martínez<sup>1,2</sup>, Eva Calvo-Sánchez<sup>1,2</sup>, Montse Corrales<sup>2,4</sup>, Bruna Santos da Silva<sup>5</sup>, Nina Roth Mota<sup>6,7</sup>, Marcelo Moraes Victor<sup>7</sup>, Luis Augusto Rohde<sup>7,8</sup>, Eugenio Horacio Grevet<sup>7,8</sup>, Claiton Henrique Dotto Bau<sup>5,7</sup>, Bru Cormand<sup>9,10,11,12</sup>, Miguel Casas<sup>1,2,3,4</sup>, Josep Antoni Ramos-Quiroga<sup>1,2,3,4</sup> & Marta Ribasés<sup>1,2,3</sup>

Methylphenidate (MPH) is the most frequently used pharmacological treatment in children with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). However, a considerable interindividual variability exists in clinical outcome. Thus, we performed a genome-wide association study of MPH efficacy in 173 ADHD paediatric patients. Although no variant reached genome-wide significance, the set of genes containing single-nucleotide polymorphisms (SNPs) nominally associated with MPH response ( $P < 0.05$ ) was significantly enriched for candidates previously studied in ADHD or treatment outcome. We prioritised the nominally significant SNPs by functional annotation and expression quantitative trait loci (eQTL) analysis in human brain, and we identified 33 SNPs tagging *cis*-eQTL in 32 different loci (referred to as eSNPs and eGenes, respectively). Pathway enrichment analyses revealed an over-representation of genes involved in nervous system development and function among the eGenes. Categories related to neurological diseases, psychological disorders and behaviour were also significantly enriched. We subsequently meta-analysed the association with clinical outcome for the 33 eSNPs across the discovery sample and an independent cohort of 189 ADHD adult patients (target sample) and we detected 15 suggestive signals. Following this comprehensive strategy, our results provide a better understanding of the molecular mechanisms implicated in MPH treatment effects and suggest promising candidates that may encourage future studies.

Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is a neurodevelopmental disorder characterised by persistent and age-inappropriate symptoms of inattention, hyperactivity and/or impulsivity<sup>1</sup>, which significantly impacts on academic, social, emotional and psychological functioning. With a worldwide prevalence ranging from 5.3 to 7.1% in school-age children and adolescents<sup>2</sup>, ADHD is one of the most common childhood

<sup>1</sup>Psychiatric Genetics Unit, Group of Psychiatry, Mental Health and Addiction, Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. <sup>2</sup>Department of Psychiatry, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain. <sup>3</sup>Biomedical Network Research Centre on Mental Health (CIBERSAM), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain. <sup>4</sup>Department of Psychiatry and Legal Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. <sup>5</sup>Department of Genetics, Institute of Biosciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. <sup>6</sup>Department of Human Genetics and Psychiatry, Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour, Radboud University Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands. <sup>7</sup>ADHD Outpatient Program, Adult Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil. <sup>8</sup>Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. <sup>9</sup>Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain. <sup>10</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain. <sup>11</sup>Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Spain. <sup>12</sup>Institut de Recerca Sant Joan de Déu (IR-SJD), Esplugues de Llobregat, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.R. (email: [marta.ribases@vhir.org](mailto:marta.ribases@vhir.org))

#### 9.1.4. Artigo submetido

Submetido para *Nature Neuroscience*. Fator de impacto: 19.912

### **Shared genetic background between children and adults with attention deficit/hyperactivity disorder**

Paula Rovira, Ditte Demontis&, Cristina Sánchez-Mora, Tetyana Zayats, Marieke Klein, Nina Roth Mota, Heike Weber, Iris Garcia-Martínez, Mireia Pagerols, Laura Vilar, Lorena Arribas, Vanesa Richarte, Montserrat Corrales, Christian Fadeuilhe, Rosa Bosch, Gemma Español, Eugenio H. Grevet, Anne Halmøy, Mara Hutz, Per M. Knappskog, Astri J. Lundervold, Diego L. Rovaris, **Bruna Santos da Silva**, Emma Sprooten, International Multi-centre persistent ADHD CollaboraTion (IMpACT), ADHD Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium (PGC), 23andMe Research Team, Alejandro Arias-Vasquez, Edmund Sonuga-Barke, Philip Asherson, Claiton Bau, Jan K. Buitelaar, Bru Cormand, Stephen V. Faraone, Jan Haavik, Stefan Johansson, Jonna Kuntsi, Henrik Larsson, Klaus Peter Lesch, Andreas Reif, Luis Augusto Rohde, Miquel Casas, Anders D. Børglum&, Barbara Franke&, Josep Antoni Ramos-Quiroga&, María Soler Artigas\*& and Marta Ribasés\*.

#### **ABSTRACT**

Attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is a common neurodevelopmental disorder characterized by age-inappropriate symptoms of inattention, impulsivity and hyperactivity that persist into adulthood in the majority of the diagnosed children. Despite several risk factors during childhood predicting the persistence of ADHD symptoms into adulthood, the genetic architecture underlying the trajectory of ADHD over time is still unclear. We set out to study the contribution of common genetic variants to the risk of ADHD across the lifespan by conducting meta-analyses of genome-wide association studies on persistent ADHD in adults and ADHD in childhood separately and comparing the genetic background between them in a total sample of 17,149 cases and 32,411 controls. Our results show nine new independent genome-wide significant loci and support a shared contribution of common genetic variants to ADHD in children and adults, with no subgroup heterogeneity among children, which may include future remitting and persistent individuals. We report similar patterns of genetic correlation between ADHD in adults, children and when combining both groups with other ADHD-related datasets and different traits and disorders. These findings confirm that persistent ADHD in adults is a neurodevelopmental disorder and extend the existing hypothesis of a shared genetic architecture underlying ADHD and different traits to a lifespan perspective.

9.1.5. *Capítulo de livro no prelo*

Editora *Grupo A/Artmed Panamericana*

**Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade in “Neurobiologia dos Transtornos Psiquiátricos”**

Diego Luiz Rovaris, **Bruna Santos da Silva**, Claiton Henrique Dotto Bau e Eugenio Horacio Grevet.

**RESUMO**

O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) apresenta etiologia multifatorial, com altas estimativas de herdabilidade, tanto em crianças quanto em adultos ( $\approx 80\%$ ). Embora o envolvimento da biologia na etiologia e curso do transtorno seja evidente, não existe ainda um marcador biológico validado para o TDAH. Como os alvos moleculares do tratamento do TDAH envolvem a neurotransmissão dopaminérgica e adrenérgica, por muito tempo o estudo desses sistemas dominou o campo de investigação da neurobiologia desse transtorno. De qualquer forma, com os avanços das ciências “ômicas”, principalmente da genômica, o entendimento da neurobiologia do TDAH tomou rumos um pouco diferentes e avançou muito nos últimos anos. Neste capítulo, são apresentados e revisados os mais recentes achados da literatura da área, fornecendo uma visão atualizada do arcabouço biológico do TDAH.

## 9.2. Não relacionadas ao tema da Tese

### 9.2.1. Artigo Publicado 4

Rovaris DL, Aroche AP, **da Silva BS**, Kappel DB, Pezzi JC, Levandowski ML, Hess ARB, Schuch JB, de Almeida RMM, Grassi-Oliveira R, Bau CHD. Glucocorticoid receptor gene modulates severity of depression in women with crack cocaine addiction. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2016 Sep;26(9):1438-1447. doi: 10.1016/j.euroneuro.2016.06.010. Fator de impacto: 4.129

Crack cocaine addicted inpatients that present more severe withdrawal symptoms also exhibit higher rates of depressive symptoms. There is strong evidence that the identification of genetic variants in depression is potentialized when reducing phenotypic heterogeneity by studying selected groups. Since depression has been associated to dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, this study evaluated the effects of SNPs in stress-related genes on depressive symptoms of crack cocaine addicts at early abstinence and over the detoxification treatment (4th, 11th and 18th day post admission). Also, the role of these SNPs on the re-hospitalization rates after 2.5 years of follow-up was studied. One hundred eight-two women were enrolled and eight SNPs in four genes (NR3C2, NR3C1, FKBP5 and CRHR1) were genotyped. A significant main effect of NR3C1-rs41423247 was found, where the C minor allele increased depressive symptoms at early abstinence. This effect remained significant after 10,000 permutations to account for multiple SNPs tested ( $P=0.0077$ ). There was no effect of rs41423247 on the course of detoxification treatment, but a slight effect of rs41423247 at late abstinence was detected ( $P=0.0463$ ). This analysis suggests that the presence of at least one C allele is worse at early abstinence, while only CC genotype appears to increase depressive symptoms at late abstinence. Also, a slight effect of rs41423247 C minor allele increasing the number of re-hospitalizations after 2.5 years was found ( $P=0.0413$ ). These findings are in agreement with previous studies reporting an influence of rs41423247 on sensitivity to glucocorticoids and further elucidate its resulting effects on depressive-related traits.

### 9.2.2. Artigo publicado 5

**da Silva BS**, Rovaris DL, Schuch JB, Mota NR, Cupertino RB, Aroche AP, Bertuzzi GP, Karam RG, Vitola ES, Tovo-Rodrigues L, Grevet EH, Bau CH. Effects of *corticotropin-releasing hormone receptor 1* SNPs on major depressive disorder are influenced by sex and smoking status. *J Affect Disord.* 2016 Nov 15;205:282-288. doi: 10.1016/j.jad.2016.08.008. Fator de impacto: 3.789

**BACKGROUND:** The corticotropin-releasing hormone receptor 1 (CRHR1) gene has been repeatedly implicated in Major Depressive Disorder (MDD) in humans and animal models; however, the findings are not absolutely convergent. Since recent evidence from genome-wide association studies suggests that narrowing the phenotypic heterogeneity may be crucial in genetic studies of MDD, the aim of this study was to evaluate the effects of CRHR1 polymorphisms on MDD while addressing the influence of sex and smoking status. **METHODS:** The association of the CRHR1 SNPs rs12944712, rs110402, and rs878886 with MDD was evaluated in 629 Brazilian adults of European descent recruited from the general population [180 (28.6%) with lifetime MDD]. The sample was subdivided according to sex and smoking status. **RESULTS:** Among nonsmokers, there were nominal associations between MDD and all tested SNPs (rs12944712,  $P=0.042$ ; rs110402,  $P=0.031$ , and rs878886,  $P=0.040$ ), regardless of sex. In addition, there were significant effects of rs110402 in women ( $P_{corr}=0.034$ ) and rs878886 in men ( $P_{corr}=0.013$ ). Among lifetime smokers, there were no significant associations between CRHR1 SNPs and MDD. **LIMITATIONS:** The lack of a depression rating scale; scarcity of information on the functionality of the CRHR1 SNPs; and relatively small sample sizes in some subgroups. **CONCLUSIONS:** Our results strengthen the evidence for the role of CRHR1 SNPs in MDD susceptibility and suggest that their effects may be modulated by sex and smoking status. These findings suggest the perspective that reducing phenotypic heterogeneity is warranted in genetic studies of MDD.

### 9.2.3. Artigo publicado 6

Rovaris DL, Schuch JB, Grassi-Oliveira R, Sanvicente-Vieira B, **da Silva BS**, Walss-Bass C, Müller D, Stolf AR, von Diemen L, Ceresér KMM, Pianca TG, Szobot CM, Kessler FHP, Roman T, Bau CHD. Effects of crack cocaine addiction and stress-related genes on peripheral BDNF levels. *J Psychiatr Res.* 2017 Jul;90:78-85. doi: 10.1016/j.jpsychires.2017.02.011. Fator de impacto: 4.000

This study examined the effects of glucocorticoid receptor (NR3C1), corticotropin-releasing hormone receptor 1 (CRHR1), and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) genes on susceptibility to crack cocaine addiction and BDNF levels. Crack addicted patients who sought treatment (n = 280) and non-addicted individuals (n = 241) were assessed. Three SNPs in NR3C1 (rs6198, rs41423247, and rs10052957), three in CRHR1 (rs12944712, rs110402, and rs878886), and one in BDNF (rs6265) were genotyped. No significant effect was seen in the case-control analyses. Crack cocaine addicted patients showed significantly lower serum BDNF levels. Significant effects were observed for NR3C1 rs41423247 and rs10052957. These effects were restricted to non-addicted individuals and they were supported by significant gene-by-disease status interactions. For CRHR1, all SNPs were associated with BDNF levels. Although there were significant effects only in the analysis restricted to non-addicted individuals, the lack of significant results in the gene-by-disease status interaction analyses suggest a general effect on BDNF levels. The haplotype analyses presented the same effect seen in the single marker analyses. This study suggests that SNPs in the NR3C1 and CRHR1 genes may influence BDNF levels, but this effect is blunted in the context of crack cocaine addiction. Therefore, our data may be interpreted in light of several studies showing pronounced effects of crack cocaine on BDNF levels. Since peripheral BDNF is a biomarker for several psychiatric phenotypes, our results may be useful in interpreting previous associations between stress-related SNPs, drug addiction, and depression.



#### 9.2.4. Artigo publicado 7

Kappel DB, Schuch JB, Rovaris DL, **da Silva BS**, Cupertino RB, Winkler C, Teche SP, Vitola ES, Karam RG, Rohde LA, Bau CHD, Grevet EH, Mota NR. Further replication of the synergistic interaction between *LPHN3* and the *NTAD* gene cluster on ADHD and its clinical course throughout adulthood. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2017 Oct 3;79(Pt B):120-127. doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.06.011. Fator de impacto: 4.185

Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) is a common and highly heritable neuropsychiatric disorder. Despite the high heritability, the unraveling of specific genetic factors related to ADHD is hampered by its considerable genetic complexity. Recent evidence suggests that gene-gene interactions can explain part of this complexity. We examined the impact of strongly supported interaction effects between the *LPHN3* gene and the *NTAD* gene cluster (*NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2*) in a 7-year follow-up of a clinical sample of adults with ADHD, addressing associations with susceptibility, symptomatology and stability of diagnosis. The sample comprises 548 adults with ADHD and 643 controls. Entropy-based analysis indicated a potential interaction between the *LPHN3*-rs6551665 and *TTC12*-rs2303380 SNPs influencing ADHD symptom counts. Further analyses revealed significant interaction effects on ADHD total symptoms ( $p=0.002$ ), and with hyperactivity/impulsivity symptom counts ( $p=0.005$ ). In the group composed by predominantly hyperactive/impulsive and combined presentation, the presence of *LPHN3*-rs6551665 G allele was related to increased ADHD risk only in individuals carrying the *TTC12*-rs2303380 AA genotype ( $p=0.026$ ). Also, the same allelic constellation is involved in maintenance of ADHD in a predominantly hyperactive/impulsive or combined presentation after a 7-year follow-up ( $p=0.008$ ). These observations reinforce and replicate previous evidence suggesting that an interaction effect between the *LPHN3* gene and the *NTAD* cluster may have a role in the genetic substrate associated to ADHD also in adults. Moreover, it is possible that the interactions between *LPHN3* and *NTAD* are specific factors contributing to the development of an ADHD phenotype with increased hyperactivity/impulsivity that is maintained throughout adulthood.

### 9.2.5. Artigo publicado 8

Müller D, Grevet EH, Panzenhagen AC, Cupertino RB, **da Silva BS**, Kappel DB, Mota NR, Blaya-Rocha P, Teche SP, Vitola ES, Rohde LA, Contini V, Rovaris DL, Schuch JB, Bau CHD. Evidence of sexual dimorphism of *HTR1B* gene on major adult ADHD comorbidities. *J Psychiatr Res.* 2017 Dec;95:269-275. doi: 10.1016/j.jpsychires.2017.09.011. Fator de impacto: 4.000

Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is a very common psychiatric disorder across the life cycle and frequently presents comorbidities. Since ADHD is highly heritable, several studies have focused in the underlying genetic factors involved in its etiology. One of the major challenges in this search is the phenotypic heterogeneity, which could be partly attributable to the sexual dimorphism frequently seen in psychiatric disorders. Taking into account the well-known sexual dimorphic effect observed in serotonergic system characteristics, we differentially tested the influence of HTR1B SNPs (rs11568817, rs130058, rs6296 and rs13212041) on ADHD susceptibility and on its major comorbidities according to sex. The sample comprised 564 adults with ADHD diagnosed according to DSM-IV criteria and 635 controls. There was no association of any HTR1B SNPs tested in relation to ADHD susceptibility. As for the comorbidities evaluated, after correction for multiple tests, significant associations were observed for both rs11568817 and rs130058 with substance use disorders ( $P_{corr} = 0.009$  and  $P_{corr} = 0.018$ , respectively) and for rs11568817 with nicotine dependence ( $P_{corr} = 0.025$ ) in men with ADHD. In women with ADHD, the same rs11568817 was associated with generalized anxiety disorder ( $P_{corr} = 0.031$ ). The observed effects of rs11568817 G allele presence conferring risk to either substance use disorders or generalized anxiety disorder according to sex, suggest an overall scenario where a higher transcriptional activity of HTR1B, resulting from the presence of this allele, is related to externalizing behaviors in men and internalizing behaviors in women. These results are consistent with and expand previous evidence of sexual dimorphism of the serotonergic system.

### 9.2.6. Artigo publicado 9

Victor MM, **da Silva BS**, Kappel DB, Bau CH, Grevet EH. Attention-deficit hyperactivity disorder in ancient Greece: The Obtuse Man of Theophrastus. *Aust N Z J Psychiatry*. 2018 Jun;52(6):509-513. doi: 10.1177/0004867418769743. Fator de impacto: 5.084

We present an ancient Greek description written by the philosopher Theophrastus in his classic book 'Characters' comparable with modern attention-deficit hyperactivity disorder. The arguments are based in one chapter of this book-The Obtuse Man-presenting features of a character closely resembling the modern description of attention-deficit hyperactivity disorder. In a free comparative exercise, we compared Theophrastus descriptions with modern Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (5th ed.; DSM-5) attention-deficit hyperactivity disorder symptoms. The sentences describing The Obtuse Man written by Theophrastus are similar to several symptoms of attention-deficit hyperactivity disorder and he would probably be currently diagnosed with this disorder as an adult. To our knowledge, this is the oldest description compatible with the current conception of attention-deficit hyperactivity disorder in adults in the Western literature. Differently than the moralistic view of ancient Greece regarding those symptoms, the medical attention-deficit hyperactivity disorder conception may be advantageous to patients since it might reduce prejudice and allow individuals to seek treatment.

### 9.2.7. Artigo publicado 10

Kappel DB, Schuch JB, Rovaris DL, **da Silva BS**, Müller D, Breda V, Teche SP, S Riesgo R, Schüler-Faccini L, Rohde LA, Grevet EH, Bau CHD. *ADGRL3* rs6551665 as a Common Vulnerability Factor Underlying Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Autism Spectrum Disorder. *Neuromolecular Med.* 2019 Jan 16. doi: 10.1007/s12017-019-08525-x. [Epub ahead of print]. Fator de impacto: 2.952

Neurodevelopmental disorders are prevalent, frequently occur in comorbidity and share substantial genetic correlation. Previous evidence has suggested a role for the *ADGRL3* gene in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) susceptibility in several samples. Considering *ADGRL3* functionality in central nervous system development and its previous association with neurodevelopmental disorders, we aimed to assess *ADGRL3* influence in early-onset ADHD (before 7 years of age) and Autism Spectrum Disorder (ASD). The sample comprises 187 men diagnosed with early-onset ADHD, 135 boys diagnosed with ASD and 468 male blood donors. We tested the association of an *ADGRL3* variant (rs6551665) with both early-onset ADHD and ASD susceptibility. We observed significant associations between *ADGRL3*-rs6551665 on ADHD and ASD susceptibilities; we found that G-carriers were at increased risk of ADHD and ASD, in accordance with previous studies. The overall evidence from the literature, corroborated by our results, suggests that *ADGRL3* might be involved in brain development, and genetic modifications related to it might be part of a shared vulnerability factor associated with the underlying neurobiology of neurodevelopmental disorders such as ADHD and ASD.

# **ANEXOS**

---

## Anexo I – Critérios diagnósticos do DSM-5 para o TDAH

---

### Critérios diagnósticos

---

**A.** Um padrão persistente de desatenção e/ou hiperatividade-impulsividade que interfere no funcionamento e no desenvolvimento, conforme caracterizado por (1) e/ou (2):

**1. Desatenção:** Seis (ou mais) dos seguintes sintomas persistem por pelo menos seis meses em um grau que é inconsistente com o nível do desenvolvimento e têm impacto negativo diretamente nas atividades sociais e acadêmicas/profissionais:

**Nota:** Os sintomas não são apenas uma manifestação de comportamentopositor, desafio, hostilidade ou dificuldade para compreender tarefas ou instruções. Para adolescentes mais velhos e adultos (17 anos ou mais), pelo menos cinco sintomas são necessários.

**a.** Frequentemente não presta atenção em detalhes ou comete erros por descuido em tarefas escolares, no trabalho ou durante outras atividades (p. ex., negligencia ou deixa passar detalhes, o trabalho é impreciso).

**b.** Frequentemente tem dificuldade de manter a atenção em tarefas ou atividades lúdicas (p.ex., dificuldade de manter o foco durante aulas, conversas ou leituras prolongadas).

**c.** Frequentemente parece não escutar quando alguém lhe dirige a palavra diretamente (p.ex., parece estar com a cabeça longe, mesmo na ausência de qualquer distração óbvia).

**d.** Frequentemente não segue instruções até o fim e não consegue terminar trabalhos escolares, tarefas ou deveres no local de trabalho (p. ex., começa as tarefas, mas rapidamente perde o foco e facilmente perde o rumo).

**e.** Frequentemente tem dificuldade para organizar tarefas e atividades (p. ex., dificuldade em gerenciar tarefas sequenciais; dificuldade em manter materiais e objetos pessoais em ordem; trabalho desorganizado e desleixado; mau gerenciamento do tempo; dificuldade em cumprir prazos).

**f.** Frequentemente evita, não gosta ou reluta em se envolver em tarefas que exijam esforço mental prolongado (p. ex., trabalhos escolares ou lições de casa; para adolescentes mais velhos e adultos, preparo de relatórios, preenchimento de formulários, revisão de trabalhos longos).

**g.** Frequentemente perde coisas necessárias para tarefas ou atividades (p. ex., materiais escolares, lápis, livros, instrumentos, carteiras, chaves, documentos, óculos, celular).

**h.** Com frequência é facilmente distraído por estímulos externos (para adolescentes mais velhos e adultos, pode incluir pensamentos não relacionados).

**i.** Com frequência é esquecido em relação a atividades cotidianas (p. ex., realizar tarefas, obrigações; para adolescentes mais velhos e adultos, retornar ligações, pagar contas, manter horários agendados).

**2. Hiperatividade e impulsividade:** Seis (ou mais) dos seguintes sintomas persistem por pelo menos seis meses em um grau que é inconsistente com o nível do desenvolvimento e têm impacto negativo diretamente nas atividades sociais e acadêmicas/profissionais:

**Nota:** Os sintomas não são apenas uma manifestação de comportamento opositor, desafio, hostilidade ou dificuldade para compreender tarefas ou instruções. Para adolescentes mais velhos e adultos (17 anos ou mais), pelo menos cinco sintomas são necessários.

- a. Frequentemente remexe ou batuca as mãos ou os pés ou se contorce na cadeira.
- b. Frequentemente levanta da cadeira em situações em que se espera que permaneça sentado (p. ex., sai do seu lugar em sala de aula, no escritório ou em outro local de trabalho ou em outras situações que exijam que se permaneça em um mesmo lugar).
- c. Frequentemente corre ou sobe nas coisas em situações em que isso é inapropriado. (Nota: Em adolescentes ou adultos, pode se limitar a sensações de inquietude.)
- d. Com frequência é incapaz de brincar ou se envolver em atividades de lazer calmamente.
- e. Com frequência “não para”, agindo como se estivesse “com o motor ligado” (p. ex., não consegue ou se sente desconfortável em ficar parado por muito tempo, como em restaurantes, reuniões; outros podem ver o indivíduo como inquieto ou difícil de acompanhar).
- f. Frequentemente fala demais.
- g. Frequentemente deixa escapar uma resposta antes que a pergunta tenha sido concluída (p. ex., termina frases dos outros, não consegue aguardar a vez de falar).
- h. Frequentemente tem dificuldade para esperar a sua vez (p. ex., aguardar em uma fila).
- i. Frequentemente interrompe ou se intromete (p. ex., mete-se nas conversas, jogos ou atividades; pode começar a usar as coisas de outras pessoas sem pedir ou receber permissão; para adolescentes e adultos, pode intrometer-se em ou assumir o controle sobre o que outros estão fazendo).

**B.** Vários sintomas de desatenção ou hiperatividade-impulsividade estavam presentes antes dos 12 anos de idade.

**C.** Vários sintomas de desatenção ou hiperatividade-impulsividade estão presentes em dois ou mais ambientes (p. ex., em casa, na escola, no trabalho; com amigos ou parentes; em outras atividades).

**D.** Há evidências claras de que os sintomas interferem no funcionamento social, acadêmico ou profissional ou de que reduzem sua qualidade.

**E.** Os sintomas não ocorrem exclusivamente durante o curso de esquizofrenia ou outro transtorno psicótico e não são mais bem explicados por outro transtorno mental (p. ex., transtorno do humor, transtorno de ansiedade, transtorno dissociativo, transtorno da personalidade, intoxicação ou abstinência de substância).

---

## Anexo II – Escala ASRS (Adult self-report scale)

Para cada item, marque com um X a opção que melhor descreve como você se sentiu e comportou-se ao longo do último mês.

ASRS	Nunca	Raramente	Às vezes	Frequentemente	Muito frequentemente
1. Com que frequência você tem dificuldade para terminar os detalhes finais de um projeto, depois que as partes mais difíceis já foram feitas?					
2. Com que frequência você tem dificuldade para colocar as coisas em ordem quando precisa fazer uma tarefa que necessite organização?					
3. Com que frequência você tem problemas para lembrar de compromissos ou obrigações?					
4. Quando você tem uma tarefa que exige muito raciocínio, com que frequência você a evita, ou adia seu início?					
5. Com que frequência você se remexe ou fica contorcendo as mãos ou os pés quando tem que ficar sentado(a) por muito tempo?					
6. Com que frequência você se sente excessivamente ativo(a) e necessitando fazer as coisas como se estivesse movido(a) por um motor?					
7. Com que frequência você comete erros por descuido quando tem que trabalhar com algo chato ou difícil?					
8. Com que frequência você tem dificuldade em manter a atenção quando está fazendo um trabalho chato ou repetitivo?					
9. Com que frequência você tem dificuldade em se concentrar no que as pessoas dizem, mesmo quando elas estão falando diretamente com você?					
10. Com que frequência você extravia ou tem dificuldade em encontrar as coisas em casa ou no trabalho?					
11. Com que frequência você se distrai com movimento ou barulho ao redor de você?					
12. Com que frequência você levanta de seu assento em reuniões ou outras situações em que se espera que você permaneça sentado(a)?					
13. Com que frequência você se sente agitado(a) ou inquieto(a)?					
14. Com que frequência você tem dificuldade para descontrair e relaxar quando tem tempo para si mesmo(a)?					
15. Com que frequência você se pega falando demais quando está em situações sociais?					
16. Quando você está em uma conversa, com que frequência você se percebe completando as frases das pessoas com quem está falando, antes que elas tenham terminado de falar?					
17. Com que frequência você interrompe os outros quando eles estão ocupados?					
18. Com que frequência você tem dificuldade de esperar em situações em que cada um tem sua vez?					



	Nun- -ca	Rara- mente	Às vezes	Frequen- temente	Muito frequente- mente
19. Com que frequência você desperdiça ou administra mal o seu tempo?					
20. Com que frequência você tem problemas para fazer um plano e cumpri-lo quando você está em uma situação em que é necessário planejamento?					
21. Com que frequência você tem dificuldade em priorizar tarefas quando você está em uma situação onde estabelecer prioridades é necessário?					
22. Com que frequência você depende dos outros para manter sua vida em ordem e prestar atenção a detalhes?					
23. Com que frequência você fica adiando as coisas até o último minuto?					
24. Com que frequência é difícil para você completar as tarefas no tempo previsto?					
25. Com que frequência você tem dificuldade para lembrar a ideia principal em coisas que você leu?					
26. Com que frequência você acha que o seu humor muda com facilidade?					
27. Com que frequência você se sente mais facilmente incomodado(a) ou sobrecarregado(a) do que outras pessoas na mesma situação?					
28. Com que frequência você tem dificuldade para controlar o seu temperamento?					
29. Com que frequência os seus sentimentos são facilmente feridos quando você é criticado?					
30. Com que frequência você sente que lhe falta autodisciplina?					
31. Com que frequência você tem dificuldade em manter o controle de várias coisas ao mesmo tempo?					
32. Com que frequência você se entedia com facilidade?					
33. Com que frequência você age sem pensar nas possíveis consequências?					
34. Com que frequência você é impaciente em conversas ou ao dirigir?					

### Anexo III – Escala SNAP-IV (Swanson, Nolan, and Pelham scale version 4)

Para cada item escolha a coluna que melhor representa você:

MTA SNAP-IV	Nem um pouco	Um pouco	Bastante	Demais
1. Falho em prestar atenção aos detalhes ou cometo erros por falta de cuidado em trabalhos ou em tarefas				
2. Tenho dificuldade para manter a atenção em tarefas ou atividades de lazer				
3. Pareço não escutar quando me falam diretamente				
4. Não sigo instruções e falho em terminar tarefas ou obrigações.				
5. Tenho dificuldades para organizar tarefas ou obrigações				
6. Evito, não gosto ou reluto em envolver-me em tarefas que me exijam manutenção de esforço mental.				
7. Perco coisas necessárias para minhas atividades (chaves, livros, lápis, material de trabalho, contas)				
8. Sou distraído por estímulos do ambiente.				
9. Sou esquecido nas atividades diárias				
10. Sou irrequieto com as mãos ou pés ou me remexe na cadeira				
11. Abandono minha cadeira em situações nas quais esperam que permaneça sentado				
12. Sou inquieto, não consigo me manter em um mesmo lugar				
13. Tenho dificuldade de me envolver silenciosamente em atividades de lazer				
14. Estou a mil ou frequentemente ajo como se estivesse “a todo vapor”.				
15. Falo em demasia				
16. Dou respostas precipitadas antes das perguntas serem completadas				
17. Tenho dificuldade para aguardar minha vez				
18. Interrompo ou me intrometo com os outros (ex. intrometo-me em conversas)				
19. Me descontrolo				
20. Discuto com os outros				
21. Ativamente desafio ou me recuso a seguir os pedidos dos chefes ou as regras				
22. Faço coisas para incomodar os outros de propósito				
23. Culpo os outros pelos meus erros ou má conduta				
24. Sou sensível ou facilmente incomodado pelos outros				
25. Sou raivoso ou ressentido				
26. Sou malvado ou vingativo				

**Anexo IV- Escalas CGI-S e CGI-I (Clinical Global Impression – Severity /  
Improvement scales)**

**CGI-S**

Considerando sua experiência clínica, como você avalia o estado mental deste paciente neste momento?

0	Não avaliado
1	Normal (ausência de sintomas)
2	Estado borderline (duvidosa, transitória ou sem prejuízo funcional)
3	Levemente doente (prejuízo funcional leve)
4	Moderadamente doente (desempenha atividades com esforço)
5	Acentuadamente doente (sintomas intensos, desempenho limitado)
6	Gravemente doente (consegue desempenhar praticamente só com assistência)
7	Extremamente doente (desempenho completamente comprometido)

**CGI-I**

A condição do paciente, comparada ao momento de admissão no projeto (antes do início do tratamento), está:

0	Não avaliado
1	Muito melhor
2	Melhor
3	Minimamente melhor
4	Não houve mudança
5	Minimamente pior
6	Pior
7	Muito pior

**Anexo V - Aprovação – Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde – HCPA (A)**

**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

**COMISSÃO CIENTÍFICA**

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

**Projeto:** 160600

**Data da Versão do Projeto:** 17/11/2016

**Pesquisadores:**

EUGENIO HORACIO GREVET  
FELIPE ALMEIDA PICON  
KATIANE LILIAN DA SILVA  
EDUARDO SCHNEIDER VITOLA  
DJENIFER KAPPEL  
VERÔNICA CONTINI  
JAQUELINE BOHRER SCHUCH  
BRUNA SANTOS DA SILVA  
DIEGO LUIZ ROVARIS  
CLAITON HENRIQUE DOTTO BAU  
RENATA BASSO CUPERTINO

**Título:** Estudo prospectivo de indivíduos com e sem transtorno de déficit de atenção/hiperatividade diagnosticados na vida adulta

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 03 de janeiro de 2017.

Prof. José Roberto Goldim  
Coordenador CEP/HCPA

## Anexo VI – Aprovação - Comissão de Ética Para o Uso de Animais - HCPA



### GRUPO DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto abaixo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) e pelas áreas de apoio indicadas pelo pesquisador.

**Projeto:** 160346

**Data de Aprovação do Projeto:** 23/08/2016

**Título:** Análise proteômica de um modelo animal do Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade, os Ratos Espontaneamente Hipertensos, após um tratamento crônico com metilfenidato

**Data de Término:** 31/12/2018

**Pesquisador Responsável:** IRACI LUCENA DA SILVA TORRES

#### Equipe de pesquisa:

CARLA DE OLIVEIRA

DOUGLAS TEIXEIRA LEFFA

Submissão	Documento	Espécie/Linhagem	Sexo/Idade	Qtd.	Data Reunião	Situação
06/07/2016	APROVAÇÃO	RATO - WISTAR KYOTO	M/90-120dias	21	23/08/2016	APROVADO
06/07/2016		RATO - SHR	M/90-120dias	21	23/08/2016	APROVADO
13/09/2016	EMENDA		-/	0	11/10/2016	APROVADO
07/04/2017	EMENDA	RATO - SHR	M/90-120dias	14	25/04/2017	APROVADO

Total de Animais: 56

  
Coordenador  
Comissão de Ética no Uso de Animais

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

**Anexo VII – Aprovação – Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde – HCPA (B)****HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO****COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE**

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

**Projeto:** 100201**Versão do Projeto:** 19/05/2010**Versão do TCLE:** 19/05/2010**Pesquisadores:**

ANDERSON RAVY STOLF

FLAVIO KAPCZINSKI

LISIA VON DIEMEN

KEILA MARIA MENDES CERESER

FELIX HENRIQUE PAIM KESSLER

CLAUDIA MACIEL SZOBOT

TATIANA ROMAN

RICARDO HALPERN

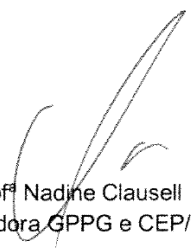
FLAVIO PECHANSKY

**Título:** Prospecção de marcadores biológicos associados à toxicidade sistêmica e neural desencadeados pelo uso de cocaína tipo crack ao longo do ciclo da vida.

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

- De acordo com a regulamentação da Resolução 340/2004 do CNS/MS o CEP/HCPA foi credenciado, através da Carta Circular Nº 037 CONEP/CNS/MS de 11 de agosto de 2004, para dar aprovação final para este projeto.

Porto Alegre, 02 de julho de 2010.



Profª Nadine Clausell  
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA

## Anexo VIII - Aprovação Comissão de Ética em Pesquisa da PUCRS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Psicologia  
Programa de Pós-Graduação em Psicologia

Ofício 063/2010 – SGL

Porto Alegre, 16 de novembro de 2010.

Senhor(a) Pesquisador(a)

A Comissão Científica da Faculdade de Psicologia da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo intitulado **“COMPORTAMENTOS MOTIVADOS EM USUÁRIAS DE CRACK: RELAÇÃO COM NEGLIGÊNCIA NA INFÂNCIA E O CRAVING”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data, sem a necessidade de passar pelo Comitê de Ética, devido à aprovação do projeto maior **“ESTILOS PARENTAIS, NEGLIGÊNCIA NA INFÂNCIA E O CRAVING EM USUÁRIAS DE CRACK: RELAÇÃO COM FUNÇÕES EXECUTIVAS, COMPORTAMENTO AGRESSIVO E MARCADORES BIOLÓGICOS”**, conforme ofício CEP nº 1229/10.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Margareth da Silva Oliveira

Coordenadora da Comissão Científica da Faculdade de Psicologia

Ilmo(a) Sr(a)

Prof. Orientador: Rodrigo Grassi de Oliveira

Pesquisador(a): Ingrid D'Avila Francke

**PUCRS**

**Campus Central**

Av. Ipiranga, 6681 – P. 11 – 9º andar – CEP 90619-900

Porto Alegre – RS – Brasil

Fone: (51) 3320-3500 – Fax (51) 3320 – 3633

E-mail: [psicologia-pg@pucrs.br](mailto:psicologia-pg@pucrs.br)

[www.pucrs.br/psipos](http://www.pucrs.br/psipos)