

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSIQUIATRIA**



**TESE DE DOUTORADO**

**ENTENDENDO AS FRONTEIRAS E A COMORBIDADE ENTRE O  
TRANSTORNO DE HUMOR BIPOLAR E O TRANSTORNO DE DÉFICIT DE  
ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES**

**CRISTIAN PATRICK ZENI**

**Orientador: Prof. Dr. LUIS AUGUSTO PAIM ROHDE**

**Co-orientador: Prof. Dr. FLAVIO KAPCZINSKI**

**Co-orientadora: Profa. Dra. MARA HUTZ**

**Porto Alegre, agosto de 2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSIQUIATRIA**



**TESE DE DOUTORADO**

**ENTENDENDO AS FRONTEIRAS E A COMORBIDADE ENTRE O  
TRANSTORNO DE HUMOR BIPOLAR E O TRANSTORNO DE DÉFICIT DE  
ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES**

**CRISTIAN PATRICK ZENI**

**Orientador: Prof.Dr. Luis Augusto Paim Rohde**

Porto Alegre, Brasil.  
2011

## CIP - Catalogação na Publicação

Zeni, Cristian Patrick

[15:24:15] Cristian Zeni 2: ENTENDENDO AS  
FRONTEIRAS E A COMORBIDADE ENTRE O TRANSTORNO DE  
HUMOR BIPOLAR E O TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E  
HIPERATIVIDADE EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES / Cristian  
Patrick Zeni. -- 2011.  
140 f.

Orientador: Luis Augusto Rohde.

Coorientadores: Flavio Kapczinski, Mara Hutz.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Médicas: Psiquiatria, Porto  
Alegre, BR-RS, 2011.

1. Psiquiatria da Infância e Adolescência. 2.  
Transtorno do Humor Bipolar. 3. Transtorno de  
Déficit de Atenção/Hiperatividade. 4. Tratamento. 5.  
Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF). I.

Elaborada pelo Sistema de Criação Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a). Título.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho não poderia ter sido realizado sem a contribuição de muitas pessoas. Agradeço em primeiro lugar aos pacientes e a seus familiares, que toleram nosso desconhecimento e nos permitem estudar suas dores e sofrimentos.

Pelo apoio afetivo e efetivo, gostaria de agradecer a meus familiares, Airton, Jucelia, Gregory e Mikael, à família de minha esposa, e à Carmen Muratore. Minhas razões de estar em um investimento contínuo por crescimento e aperfeiçoamento: Aline, minha esposa, e meu filho Gabriel. Filho, se um dia chegares a ler este trabalho, gostaria que soubesses que a parte mais difícil dele (apesar das dúvidas estatísticas, da pressão por produção, do cansaço de chegar do consultório e escrever artigos e tese), era ficar no computador trabalhando, pensando que podia estar brincando contigo. Que bom que conseguimos fazer os dois!!! E graças à Aline. Esposa querida, tua ajuda neste período só reforça a qualidade de nosso companheirismo, e o apoio que sempre poderás ter também da minha parte. ALOHA!!

Ao Programa de Pós-Graduação em Psiquiatria da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, altamente qualificado, do qual tenho orgulho em participar desde 2003. Ao Departamento de Psiquiatria e Medicina Legal e ao Serviço de Psiquiatria da Infância e Adolescência da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. À CAPES e ao FIPE pelo apoio na realização deste projeto.

Aos membros do Programa de Déficit de Atenção e Hiperatividade, em especial aos Drs. Carlos Maia, Thiago Pianca e Fernanda Krieger, e à secretária Clarissa Paim.

À Dra. Mara Hutz, Ana Paula Guimarães, Angélica Salatino-Oliveira do Departamento de Genética da UFRGS pela parceria neste projeto e nos próximos.

Ao Prof. Flavio Kapczinski e à equipe do Laboratório de Psiquiatria Molecular, em especial à Bianca Wollenhaupt de Aguiar, cujo trabalho conjunto vem sendo extremamente prazeroso e promissor.

A todas as equipes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre que auxiliaram na identificação de pacientes para este trabalho, do Ambulatório para Adolescentes (Lilian Hagel, Alberto Manieri, Ricardo Feijó, Maria Aparecida Pretto) e da Unidade Básica de Saúde Santa Cecília, à Dra. Claudia Maciel Szobot e sua equipe.

Parceiros fundamentais, agradeço a todos os membros do ProCAB. Nestes 3 anos de existência, muito trabalho feito e muito trabalho por fazer. Nossos estagiários, Julio Bernardi, Úrsula Maldaner, Talita Silva, ou nosso ex-estagiário hoje residente do HCPA, Henrique Ludwig, a equipe de neuropsicologia e psicopedagogia - Roberta Coelho, Thamis Zeni, Juliana Brun e Lanuzia Brum, às colegas Berenice Rheinheimer e Gledis Motta, e ao Gabriel Pheula, parceiro desde o início dos primeiros trabalhos. Em uma parceria que abrange conhecimento técnico, orientação para a carreira e para a vida, muitos conselhos, ditados, e tudo que faz parte de uma grande amizade, quero agradecer à Silzá Tramontina, chefe e sócia no ProCAB.

Luis Augusto Rohde. Nestes nove anos de convivência, são incontáveis as lições. Modelo de excelência profissional e capacidade de produção. A chance de aprendizado e convivência contigo definiu em grande parte meu desenvolvimento pessoal e acadêmico. Muito obrigado.

## SUMÁRIO

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	
2.1 Transtorno Bipolar na Infância e Adolescência (THB)	18
2.2 Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH)	21
2.3 Comorbidade e Diagnóstico Diferencial entre o THB e o TDAH	24
2.4 Papel da Genética nos estudos para a diferenciação do THB e TDAH	28
2.5 Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF)	34
2.6 Níveis Periféricos de BDNF e sua Relação com THB e TDAH	36
2.7 Tratamento do THB na Presença da Comorbidade com TDAH	40
3. OBJETIVOS	43
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
5. ARTIGOS	
Artigo 1	58
Artigo 2	87
6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	112
7. ANEXOS	
a. Artigo suplementar	117
b. Termo de Consentimento Informado	139

**ABREVIATURAS E SIGLAS**

THB	Transtorno de Humor Bipolar
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro)
THB+TDAH	Transtorno de Humor Bipolar em comorbidade com Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade
BD	Bipolar Disorder
ADHD	Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder
BD+ADHD	Bipolar Disorder comorbid with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder
THBIA	Transtorno de Humor Bipolar na Infância e Adolescência
Val66Met	Polimorfismo do gene do BDNF
ProCAB	Programa para Crianças e Adolescentes com Transtorno Bipolar
PRODAH	Programa de Déficit de Atenção e Hiperatividade
THB-I	Transtorno de Humor Bipolar do tipo I
THB-II	Transtorno de Humor Bipolar do tipo II
THB-SOE	Transtorno de Humor Bipolar Sem Outra Especificação
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
DSM-IV	Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais – Quarta Edição
Mania-SOE	Mania Sem Outra Especificação

SMD	Severe Mood Dysregulation
DGH	Desregulação Grave do Humor
TDO	Transtorno Desafiador Opositivo
TC	Transtorno de Conduta
5HTTLPR	Polimorfismo na região promotora do gene do transportador da serotonina
COMT	Gene da catecol-O-metiltransferase
AVPR1A	Gene da arginina-vasopressina
RORA e RORB	Genes do receptor órfão relacionado ao RAR
GAD1	Gene da Glutamato Descarboxilase 1
OR	Odds Ratio (Razão de Chances)
CI	Confidence Interval (Intervalo de Confiança)
SLC6A3	Gene do transportador da dopamina
Ca <sup>++</sup>	Cálcio
BCL2	Gene da família das proteínas reguladoras da apoptose BCL2
mRNA	RNA Mensageiro
MFD	Metilfenidato



## RESUMO

Introdução: Em crianças e adolescentes, o Transtorno de Humor Bipolar (THB) é associado a danos devastadores no desenvolvimento. O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH), caracterizado por sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade também causa prejuízo funcional significativo. O diagnóstico diferencial entre os dois transtornos é puramente clínico e, até o momento, há poucos estudos avaliando diferenças neurobiológicas. Diversas pesquisas sugerem a participação do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), cujo papel não foi elucidado em crianças e adolescentes com THB e com TDAH. Apesar das altas taxas de comorbidade entre o THB e o TDAH, de uma pior resposta ao tratamento e de um pior funcionamento psicossocial quando da comorbidade, apenas dois estudos avaliaram a resposta ao tratamento especificamente neste grupo de pacientes.

Objetivos: O objetivo principal deste trabalho é avançar no entendimento do papel do BDNF na psicopatologia do THB e do TDAH, visando sua diferenciação. O tratamento da comorbidade com estimulantes também foi estudado.

Métodos: A transmissão do alelo Val66 do BDNF foi avaliada em famílias de crianças e adolescentes com THB e TDAH, assim como o efeito do gene no nível sérico da proteína do BDNF entre os grupos. Foi realizada a comparação dos níveis séricos entre pacientes com THB em comorbidade com TDAH e TDAH isolado. Um estudo clínico cruzado com estimulantes foi realizado em crianças e adolescentes com THB e TDAH em comorbidade que tinham apresentado remissão dos sintomas de humor com o uso de aripiprazol, mas persistência dos sintomas de TDAH. Os sintomas de mania,

depressão, desatenção e hiperatividade foram acompanhados ao longo de quatro semanas de tratamento, duas com placebo ou metilfenidato e duas com o tratamento inverso.

Resultados: Na investigação da transmissão do gene do BDNF em crianças e adolescentes não foi detectada diferença significativa na transmissão do alelo Val66. Tampouco foi observada diferença significativa nos níveis séricos da proteína do BDNF entre os pacientes com THB em comorbidade com TDAH, quando comparados aos pacientes com TDAH e controles. No estudo cruzado com crianças e adolescentes com THB em comorbidade com TDAH, não houve diferenças entre os grupos com placebo ou estimulantes na resposta ao tratamento nos sintomas de TDAH. Os sintomas de humor mantiveram-se estáveis a despeito do uso de metilfenidato.

Conclusões: Os achados quanto ao gene do BDNF não sugerem sua participação na neurobiologia do THB ou no TDAH, ou que devido à herança poligênica característica dos transtornos mentais, sua participação seja pequena. O achado de diferença significativa entre os níveis séricos do BDNF de crianças e adolescentes com THB+TDAH e TDAH indica que esse tema deve ser mais estudado, e, caso seja também encontrado de forma consistente por outros grupos, possa vir a ser utilizado como marcador biológico na diferenciação diagnóstica entre essas condições. No estudo de tratamento da comorbidade entre THB e TDAH, a ausência de resposta ao metilfenidato nos sintomas de TDAH em pacientes que apresentam a comorbidade reforça a evidência de que há pior resposta ao tratamento neste grupo, dado o elevado tamanho de efeito do metilfenidato no tratamento do TDAH em isolado.

O estudo de fatores biológicos para um melhor entendimento da psicopatologia e conseqüente diferenciação dos transtornos mentais tem extrema relevância porque a

identificação destes fatores pode auxiliar na elaboração de tratamentos mais precisos, urgentemente necessários devido às graves conseqüências do THB e do TDAH nas vidas dos pacientes e de suas famílias. A criação de um programa específico para Crianças e Adolescentes com Transtorno Bipolar (ProCAB) e de uma linha de pesquisa com foco na etiologia e tratamento possibilitam uma constante geração de conhecimento nesta área, onde poucos estudos estão disponíveis.

Palavras-chave: Transtorno de Humor Bipolar, THB, Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade, TDAH, crianças e adolescentes, tratamento, comorbidade, diagnóstico diferencial, Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro, BDNF.

## ABSTRACT

Introduction: Bipolar Disorder (BD) in children and adolescents is associated to devastating developmental deficits. Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD), characterized by inattention, hyperactivity, and impulsivity, also promotes significant impairment. Differential diagnosis between both conditions is purely clinical – currently, there are scarce investigations on neurobiological differences. Several studies suggest the participation of the Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in these disorders, whose role has not been elucidated in BD and ADHD in children and adolescents. Despite high comorbidity rates between BD and ADHD, worse psychosocial functioning, and worse response to treatment, only two studies addressed treatment response specifically in this group of patients.

Objectives: promote advances in understanding the role of BDNF in the psychopathology of BD and ADHD. The treatment of the comorbidity was also studied.

Methods: Transmission of the Val66 allele at the BDNF was assessed in children and adolescents with BD and ADHD, as well as the effect of the gene on the serum levels of BDNF protein in both conditions. BDNF serum levels were compared between patients with BD comorbid with ADHD, and ADHD. A crossover clinical trial with stimulants and placebo was performed with children and adolescents preseting BD and comorbid ADHD. Manic, depressive, inattention and hyperactivity symptoms were assessed along a 4-week treatment, 2 weeks in each treatment arm (placebo or stimulants).

Results: There was no significant transmission of the Val66 allele at the BDNF gene in children and adolescents with BD or ADHD. A significant difference in BDNF protein serum levels between BD+ADHD when compared to ADHD alone and controls. In the crossover trial with children and adolescents with BD and comorbid ADHD, we did not observe differences between the placebo and stimulant treatment groups in the response of ADHD symptoms. Mood symptoms remained stable despite the use of methylphenidate.

Conclusions: our results regarding the BDNF gene do not suggest its participation in the neurobiology of BD or ADHD, or that due to the polygenic characteristic of mental disorders, that this gene confers a only a small risk, undetectable in our sample. The finding of a significant difference in BDNF serum levels between BD comorbid with ADHD, and ADHD alone warrants further investigation, and in case replication studies with larger samples from other groups are positive, BDNF serum levels might be used as a biological marker in the diagnostic difference between these conditions. In the investigation of the treatment of the comorbidity between BD and ADHD, the absence of different responses between placebo and methylphenidate in ADHD symptoms strengthens the evidence that there is a worse response to treatment in this group, given the large effect size of methylphenidate response in the treatment of ADHD alone.

The quest for biological markers for a better understanding of the psychopathology and subsequent differentiation of mental disorders is extremely relevant. The identification of these factors may facilitate the creation of more accurate treatment regimens, urgently needed due to the severe developmental consequences of BD and ADHD in the patients' and families' lives. In this sense, the creation of a specific

outpatient program for children and adolescent BD (ProCAB), a research line with focus on risk factors and treatment, will enable a Constant generation of knowledge in this área, where scarce data is available.

Key-words: Bipolar Disorder, BD, Attention-Deficit/Hiperactivity Disorder, ADHD, children and adolescents, treatment, comorbidity, differential diagnosis, Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF.

## INTRODUÇÃO

O transtorno de humor bipolar (THB) é caracterizado por graves oscilações de humor. Os indivíduos podem apresentar períodos de mania ou hipomania (períodos de elevação de humor) e também podem ser acometidos de episódios depressivos (APA, 1994). Essas oscilações ocorrem com intensidade tal que, com esses sintomas, há grave prejuízo para o indivíduo e seu meio.

O THB na Infância e Adolescência (THBIA) é associado a um dano devastador no desenvolvimento, causando déficits no desempenho escolar, problemas de relacionamento interpessoal, dificuldades familiares e redução da qualidade de vida.

Além disso, os jovens com esse transtorno são mais propensos a alto risco de suicídio, psicose, exposição a riscos sexuais, ou uso de drogas. Os indivíduos também apresentam baixa taxa de recuperação completa dos sintomas e alta recidiva de novas crises de humor (Birmaher et al., 2006; Biederman et al., 2004; Carlson et al., 2002; Findling et al., 2001; Geller et al., 2000a; Geller et al., 2004a).

O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) é um transtorno de início na infância, crônico, caracterizado por sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade que causam prejuízo funcional significativo, cuja prevalência situa-se ao redor de 5% em amostras de diversos países (Polanczyk et al. 2007; Biederman et al., 2005).

O diagnóstico diferencial entre os dois transtornos é difícil devido à sobreposição de sintomas (pelo menos 3 dos sintomas de mania são os mesmos no TDAH), ao curso do THB na infância e adolescência (mais frequentemente crônico que episódico) e pela

presença de irritabilidade em cerca de 71% dos pacientes com TDAH (Biederman et al., 1995; Craney et al., 2003; Gallanter & Leibenluft, 2008). Esta diferenciação tem impacto importante nas decisões diagnósticas e terapêuticas. No entanto, até o momento, não há marcadores biológicos que auxiliem nesta diferenciação.

Dentre os fatores etiológicos biológicos estudados que podem ser estudados como marcadores desses transtornos, os fatores genéticos têm grande importância para o estabelecimento do THBIA. Um quadro semelhante é encontrado no TDAH, onde aproximadamente 78% da variância pode ser explicada por fatores genéticos (Kato, 2007; Faraone et al., 2005).

Um dos genes candidatos estudado em THB é o gene do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF). Essa molécula da classe das neurotrofinas é reconhecida como tendo um papel importante na sobrevivência, diferenciação e crescimento neuronal durante a infância e vida adulta (Hashimoto et al., 2004). Alguns estudos demonstram associação significativa entre um polimorfismo funcional do gene BDNF, causado pela substituição de valina para metionina no códon 66 do polimorfismo Val66Met (do cromossomo 11p13), e o transtorno de humor bipolar (Neves-Pereira et al., 2002; Strauss et al., 2004; Geller et al., 2004b).

Além dos achados do gene do BDNF como candidato para ser um marcador na diferenciação de THB e TDAH, os níveis plasmáticos de BDNF apresentam correlação com o nível cerebral do BDNF, e se demonstraram diminuídos em pacientes adultos deprimidos, evidenciando correlação negativa com os escores de depressão e mania (Cunha et al., 2006; Machado-Vieira et al., 2007). O único estudo que avaliou crianças e adolescentes com THB, avaliando os níveis plaquetários do BDNF (Pandey et al., 2008),



demonstrou que, após 8 semanas de tratamento, a expressão gênica do BDNF medida através do RNAm dos linfócitos ficava mais elevada em níveis semelhantes aos de indivíduos hígidos. Esses dados sugerem que o BDNF pode ser um bom candidato para a identificação do dano neuronal causado pelo THB, e que pode haver melhora e até normalização dos níveis desta neurotrofina com a realização de tratamento. Também é um dos primeiros marcadores biológicos a ser identificado, com potencial para auxiliar na diferenciação entre crianças e adolescentes com THB e/ou TDAH.

Há prejuízo adicional no funcionamento e desenvolvimento das crianças e adolescentes com THB devido à alta taxa de comorbidades (Kowatch et al., 2005). Uma das comorbidades mais prevalentes é o Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH). O TDAH ocorre em 29 a 98% das crianças e adolescentes com THB. Quando o THB e o TDAH estão presentes, predizem uma pior resposta ao tratamento e um pior funcionamento psicossocial (Consoli et al. 2007, Strober et al. 1998). Entretanto, até o momento apenas dois estudos avaliaram a resposta ao tratamento especificamente neste grupo de pacientes (Scheffer et al., 2005; Findling et al., 2006).

O presente trabalho se propõe a estudar o papel do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro no THB e no TDAH, através do estudo de fatores genéticos e bioquímicos. Acreditamos que será possível contribuir para um maior entendimento das bases biológicas dos transtornos, tanto da comorbidade, quanto da sua diferenciação. A estrutura que foi organizada e na qual foi realizada a coleta destes dados (Programa para Crianças e Adolescentes com Transtorno Bipolar – ProCAB) proporcionou a criação de uma linha de pesquisa em Transtorno Bipolar na Infância e Adolescência. Trabalhando em parceria com outros programas similares (como o Programa de Déficit de Atenção e

Hiperatividade - PRODAH) foi realizado um estudo do uso do metilfenidato em crianças e adolescentes com THB e TDAH, estabilizados dos sintomas de THB, mas sintomáticos do ponto de vista do TDAH, como será visto no segundo artigo desta tese.

Para a revisão bibliográfica, foi realizada uma busca através do sistema Pubmed até agosto de 2011, utilizando-se as palavras chaves “ADHD, Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder, Bipolar Disorder, treatment, comorbidity, differential diagnosis, Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF” e o cruzamento entre elas.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Transtorno do Humor Bipolar na Infância e Adolescência

O Transtorno do Humor Bipolar na Infância e Adolescência (THBIA) sempre causou controvérsia entre os pesquisadores. No início, sua existência era questionada. Kraepelin (1921) citado por Weller et al.(1995) acreditava que mania existia em crianças pré-púberes e que a ocorrência aumentava com o início da puberdade. De 900 pacientes com mania por ele estudados, 0,4% tiveram o início da mania antes dos 10 anos de idade. Kraepelin também apresentou o caso de um menino de 5 anos de idade com mania. Campbell, em 1955, publicou no *Journal of the American Medical Association* uma revisão da literatura existente na época sobre a psicose maníaco-depressiva em crianças e encontrou também diversos autores que descartavam a possibilidade dessa doença ocorrer em crianças. Há na literatura um caso que remonta aos 11 meses e meio de idade (La Grone et al., 1981).

Já em 1955, Campbell comentava que, se todos os casos fossem reconhecidos, a doença ocuparia uma prevalência significativa na população psiquiátrica infantil (Campbell, 1955). Em adultos, considerando quadros de THB do tipo I (THB-I), tipo II (THB-II) e do tipo Sem Outra Especificação (THB-SOE), encontramos prevalências de 1 a 2.4% (Merikangas et al., 2007). Na infância e adolescência, os estudos existentes até o momento sugerem que cerca de 0.6 a 1% dos indivíduos nesta faixa etária apresentam THB (McClellan et al., 2007).

De acordo com o recenseamento realizado em 2010 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 25.77% da população brasileira tem entre 5-19 anos no Brasil (47,5 milhões de crianças e adolescentes). Com uma prevalência de 0.6-1%, pode haver de 285.000 a 475.000 crianças e adolescentes sofrendo deste grave transtorno mental no Brasil.

Nos últimos anos, o THBIA vem recebendo maior atenção da comunidade científica e da população em geral. Em função desse maior reconhecimento, observou-se um grande aumento (cerca de 5 vezes) na quantidade das consultas ambulatoriais destinadas ao atendimento de transtorno bipolar para crianças e adolescentes nos últimos 10 anos (Moreno et al., 2007).

À medida que a existência do THBIA deixou de ser questionada, a discussão passou a ser sobre quais os critérios que devem ser utilizados para um diagnóstico preciso (Carlson et al., 2001; Axelson et al., 2006). Considerando que os critérios diagnósticos para THB do Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais – Quarta Edição (DSM-IV) foram estabelecidos baseados em pacientes em idade adulta e desconsiderando as especificidades de cada estágio do desenvolvimento, questiona-se a necessidade de elaboração de critérios próprios para o transtorno na infância e adolescência, pois há várias diferenças entre a apresentação do THB em adultos e em idades precoces (Tramontina et al., 2003). Em crianças, é mais freqüente a ocorrência de sintomatologia mista, com sintomas maníacos e depressivos ocorrendo ao mesmo tempo, ou alternando-se de forma muito rápida, muitas vezes em questão de horas (Goodwin et al., 1990). Na infância é menos comum a ocorrência de humor eufórico, sendo a irritabilidade a alteração de humor mais freqüente, associada a uma pobre capacidade de regulação das

emoções e altas taxas de agressividade pela incapacidade de tolerar frustrações. Em relação à delimitação de episódios, foi observado que, na infância, a duração é muito mais longa, podendo um único episódio durar mais de 2 anos. Outro aspecto verificado é que as crianças com a doença tem uma melhora menos significativa com o uso da medicação que os adultos. Frequentemente, esses pacientes necessitam de duas ou três medicações para a estabilização dos sintomas, mesmo após o controle dos sintomas agudos (Zeni e Tramontina, no prelo; Tramontina et al., 2007a). Em estudo que comparou as características clínicas do THB quando de início antes dos 18 anos e após os 40 anos (58 pacientes e 39 pacientes, respectivamente), foi observado que o grupo de pacientes com início precoce apresentou a forma mais grave da doença, com mais sintomas psicóticos ( $p=0.03$ ), mais sintomas mistos ( $p=0.01$ ), maior comorbidade com transtorno de pânico ( $p=0.01$ ) e menor resposta profilática ao lítio contra novos episódios ( $p=0.04$ ) (Schürhoff et al., 2000).

Leibenluft e colaboradores propuseram uma divisão fenotípica do transtorno de humor bipolar na infância e adolescência em quatro grupos, de acordo com os sintomas, sua duração e presença de episodicidade (Leibenluft et al., 2003a; Krieger et al., 2011), visando a facilitação do diálogo entre clínicos e pesquisadores. São eles:

I) Fenótipo restrito: Presença clara de episódio de mania preenchendo todos os critérios do DSM-IV, incluindo humor eufórico e/ou expansivo como critério “A”.

II) Fenótipo intermediário – Mania Sem Outra Especificação (SOE): Presença dos critérios de mania, mas sem a duração necessária dos sintomas, 7 dias para mania e 4 dias para hipomania.

III) Fenótipo intermediário – Irritabilidade como critério “A”: Presença clara

de episódio de mania preenchendo todos os critérios do DSM-IV e irritabilidade, mas não euforia e humor expansivo como critério diagnóstico “A”.

IV) Fenótipo amplo – Severe mood dysregulation (SMD) ou Desregulação Grave do Humor (DGH): Presença de irritabilidade crônica, de curso não episódico, sintomas de hipervigilância e episódios de reatividade exacerbada a estímulos negativos.

Esta última categoria tem sido alvo de muita discussão, e possivelmente constará na próxima edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais<sup>1</sup>, pois alberga um grupo de pacientes com irritabilidade que até então não preenchia especificamente critérios para Transtorno Bipolar, mas tampouco sua caracterização era adequadamente compreendida nos sintomas de Transtorno Desafiador Opositivo, ou de Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade. Essa proposta parece um grande acréscimo no campo da psiquiatria da infância e adolescência, mas também vai gerar novas discussões, até porque há grande sobreposição de sintomas entre esta nova entidade diagnóstica (DGH) com outras, como o TDAH, uma vez que mais de 80% dos pacientes com DGH também apresentam TDAH (Brotman et al., 2007; Krieger et al., 2011).

## 2.2 Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH)

O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) é um transtorno de início na infância, cuja prevalência situa-se entre ao redor de 5 % em amostras de diversos países (Polanczyk et al., 2007). É um transtorno crônico, caracterizado por

---

<sup>1</sup> <http://www.dsm5.org/proposedrevisions/pages/proposedrevision.aspx?rid=397>

sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade que causam prejuízo funcional. (APA, 1994). A desatenção se traduz em distraibilidade, em sonhar acordado e pela dificuldade em terminar tarefas; a hiperatividade se manifesta na inquietação motora e fala excessiva, enquanto que a impulsividade é observada na dificuldade em esperar, na interrupção das conversas dos outros e intrusividade (Rohde et al., 1997). Os critérios são apresentados a seguir:

#### Critérios Diagnósticos do TDAH (APA, 1994)

##### A. Ou (1) ou (2)

1) seis (ou mais) dos seguintes sintomas de desatenção persistiram por pelo menos 6 meses, em grau mal-adaptativo e inconsistente com o nível de desenvolvimento:

##### Desatenção:

- (a) freqüentemente deixa de prestar atenção a detalhes ou comete erros por descuido em atividades escolares, de trabalho ou outras
- (b) com freqüência tem dificuldades para manter a atenção em tarefas ou atividades lúdicas
- (c) com freqüência parece não escutar quando lhe dirigem a palavra
- (d) com freqüência não segue instruções e não termina seus deveres escolares, tarefas domésticas ou deveres profissionais (não devido a comportamento de oposição ou incapacidade de compreender instruções)
- (e) com freqüência tem dificuldade para organizar tarefas e atividades
- (f) com freqüência evita, antipatiza ou reluta a envolver-se em tarefas que exijam esforço mental constante (como tarefas escolares ou deveres de casa)
- (g) com freqüência perde coisas necessárias para tarefas ou atividades (por ex., brinquedos, tarefas escolares, lápis, livros ou outros materiais)
- (h) é facilmente distraído por estímulos alheios à tarefa
- (i) com freqüência apresenta esquecimento em atividades diárias

(2) seis (ou mais) dos seguintes sintomas de hiperatividade persistiram por pelo menos 6 meses, em grau mal-adaptativo e inconsistente com o nível de desenvolvimento:

##### Hiperatividade:

- (a) freqüentemente agita as mãos ou os pés ou se remexe na cadeira
- (b) freqüentemente abandona sua cadeira em sala de aula ou outras situações nas quais se espera que permaneça sentado
- (c) freqüentemente corre ou escala em demasia, em situações nas quais isto é inapropriado (em adolescentes e adultos, pode estar limitado a sensações subjetivas de inquietação)
- (d) com freqüência tem dificuldade para brincar ou se envolver silenciosamente em

atividades de lazer

(e) está freqüentemente "a mil" ou muitas vezes age como se estivesse "a todo vapor"

(f) freqüentemente fala em demasia

Impulsividade:

(g) freqüentemente dá respostas precipitadas antes de as perguntas terem sido completadas

(h) com freqüência tem dificuldade para aguardar sua vez

(i) freqüentemente interrompe ou se mete em assuntos de outros (por ex., intromete-se em conversas ou brincadeiras)

B. Alguns sintomas de hiperatividade-impulsividade ou desatenção que causaram prejuízo estavam presentes antes dos 7 anos de idade.

C. Algum prejuízo causado pelos sintomas está presente em dois ou mais contextos (por ex., na escola [ou trabalho] e em casa).

D. Deve haver claras evidências de prejuízo clinicamente significativo no funcionamento social, acadêmico ou ocupacional.

E. Os sintomas não ocorrem exclusivamente durante o curso de um Transtorno Invasivo do Desenvolvimento, Esquizofrenia ou outro Transtorno Psicótico e não são melhor explicados por outro transtorno mental (por ex., Transtorno do Humor, Transtorno de Ansiedade, Transtorno Dissociativo ou um Transtorno da Personalidade).

Os prejuízos causados geram importantes custos sociais, desgaste no relacionamento familiar, assim como efeitos negativos na auto-estima das crianças e adolescentes, que podem ser fatores de risco para inúmeros outros problemas de saúde mental como uso abusivo ou dependência de drogas (Biederman et al., 1991; Rohde et al., 1999; Barkley et al., 2002).

Estudos sobre a evolução do TDAH na adolescência e vida adulta demonstram que os sintomas persistem em pelo menos 70% dos acometidos na adolescência e 50% dos pacientes na idade adulta (Wilens et al., 2002).



### 2.3 Comorbidade e Diagnóstico Diferencial entre o THB e o TDAH

Crianças e adolescentes com THB apresentam uma elevada taxa de comorbidades. (Tramontina et al., 2003; Pavuluri et al., 2005a; Findling et al., 2001; Kafantaris et al., 2003). O transtorno mais comumente encontrado em pacientes com Transtorno Bipolar é o Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) (Kowatch et al., 2005). O TDAH ocorre em 40 a 90% dos pacientes nas amostras clínicas. Outras comorbidades frequentes são o Transtorno Desafiador Opositivo (TDO) e o Transtorno de Conduta (TC), que existem em cerca de 25-79% e 11-30% dos pacientes com THB, respectivamente. Esses últimos se caracterizam por um padrão de sintomas de hostilidade, desobediência e oposição a figuras de autoridade, como pais e professores, no caso do TDO, ou por agressividade física, destruição de propriedades alheias, maus-tratos contra pessoas ou animais, brigas com armas e fugas de casa, no caso do TC. Especialmente em adolescentes, é comum a ocorrência de Transtornos de Ansiedade (15-43%), que se caracterizam por um padrão de preocupação intensa com situações do cotidiano, associado a sintomas físicos (suor intenso, diarreia, taquicardia) e à evitação de situações ansiogênicas (como ir à escola, ou encontrar um amigo). Também, nessa idade, deve ser investigado o uso de substâncias psicoativas, já que os pacientes podem iniciar seu uso durante os episódios afetivos (prevalência de 5-29%).

A presença de comorbidades gera prejuízo adicional no funcionamento e desenvolvimento das crianças e adolescentes e pode provocar uma pior resposta ao tratamento (Consoli et al., 2007). Dadas as altas taxas de prevalência e o prejuízo, estudaremos de forma mais pormenorizada este grupo de pacientes, com THB e TDAH.

Além dos desafios impostos pela presença da comorbidade, quando o THB e o TDAH ocorrem isoladamente em crianças e adolescentes, pode ser muito difícil a sua distinção. Isso ocorre por várias razões, e a distinção entre THB e TDAH também foi alvo de muitos estudos (Galanter et al., 2008; Kent et al., 2003; Post et al., 2004). Salientamos algumas destas razões:

- a) sobreposição de sintomas: alterações da atenção, da atividade e da fala podem acontecer em ambos transtornos.

Em 1995, Milberger et al. avaliaram o impacto da utilização do método de proporcionalidade na taxa de retenção diagnóstica em uma amostra clínica de crianças e adolescentes com THB e TDAH. Para o diagnóstico de THB, são necessários 3 de 7 sintomas (43%) para o diagnóstico quando presentes euforia ou grandiosidade, e 4 de 7 sintomas quando presente somente irritabilidade (57%);

Descartando os sintomas que se sobrepunham com TDAH (dos 7 critérios para THB, retirava-se os 3 sintomas que se sobrepõem, e restam 4 sintomas– este é o método de subtração), mantiveram o diagnóstico de THB cerca de 47% dos casos de THB.

Pelo método de proporção, quando há euforia ou grandiosidade, 43% dos sintomas seriam necessários, ou seja, 2 dos 4 (50%) sintomas remanescentes. Na presença de irritabilidade, 2,5 (63%) de 4 sintomas. Com isto, se recria um limiar proporcional aos critérios originais. Desta forma, mantiveram o diagnóstico de THB cerca de 80% dos casos de THB.

Nessa mesma amostra, cerca de 11% dos pacientes apresentavam a comorbidade entre THB e TDAH. Ao aplicar-se o método de subtração, 6% mantinham a

comorbidade, e pelo método de proporção, 10% seguiam com ambos diagnósticos (Milberger et al., 1995).

Irritabilidade é um sintoma cardinal presente em mais de 90% dos pacientes com THBIA, mas pode não auxiliar no diagnóstico diferencial, uma vez que não é um sintoma específico, ocorrendo, por exemplo, em mais de 70% dos pacientes com TDAH, particularmente nos pacientes com TDAH que tem a comorbidade com o Transtorno Desafiador Opositivo (TDO). Alguns grupos de pesquisadores consideram os sintomas de elevação do humor e a grandiosidade essenciais para o diagnóstico do THB de início precoce, enquanto que a irritabilidade isolada é aceita por outros, contínua ou episódica (Geller et al.,1998; Wozniak et al.,1995; Biederman et al., 1995).

Os sintomas que facilitam a diferenciação são euforia, grandiosidade, pensamentos rápidos/fuga de idéias, diminuição da necessidade de sono e hipersexualidade (Geller et al., 2002). Além destes, psicose e ideação ou tentativa de suicídio são raros em quadros de TDAH (Post et al., 2004).

b) episodicidade:

Há uma premissa básica da ocorrência episódica do THB. Os pesquisadores que defendem essa idéia ressaltam o fato de que não podemos fazer o diagnóstico de THB se não houve clara mudança no padrão de funcionamento prévio ou se os sintomas não são melhor explicados por questões ambientais, como falta de limites no manejo das crianças e adolescentes (Carlson et al.,1998; Petresco et al.,2008; Geller et al., 2002). Por outro lado, alguns pesquisadores reportam que muitas crianças e adolescentes com THB podem apresentar sintomas de forma contínua (Wozniak et

al.,1995; Biederman et al., 1995). Alguns estudos sugerem que até 83% dos pacientes apresentem um quadro crônico, ao invés de episódico (Wozniak e Biederman, 1997). Esse quadro corresponde ao da mania atípica em adultos, que ocorre em cerca de 30% dos pacientes, e é considerado uma forma mais grave de mania, ligado a uma pior resposta ao tratamento, ao início mais precoce e ao uso de substâncias.

c) sintomas residuais:

Como uma grande parte dos pacientes com THB segue apresentando sintomas entre episódios, como irritabilidade e distraibilidade, pode ser difícil demarcar o início e o fim das crises. Em nosso grupo, optamos por incluir o TDAH como comorbidade quando os sintomas de TDAH tiveram início antes dos sintomas de THB, e quando observou-se piora dos sintomas de TDAH durante episódios de humor (Zeni et al., em preparação).

d) Outros: como referido anteriormente, os estudos clínicos demonstram altas taxas de comorbidade entre o TDAH e o THB. O local de condução do estudo, a idade dos participantes, a idade de início do THB, a fonte de encaminhamento, e a forma de avaliação diagnóstica também podem influenciar estes resultados (Kowatch et al., 2005; Jaideep et al., 2006). Como um exemplo baseado em nossa observação, vemos que os familiares muitas vezes dão uma informação na entrevista de triagem, outra durante o questionário semi-estruturado, e ainda outra na avaliação clínica que fazem parte de nosso ambulatório. O diagnóstico baseado nos relatos traz dados ainda mais variáveis quando as entrevistas são conduzidas com o pai ou a mãe do paciente, ou quando o paciente participa da avaliação.

Mesmo o uso de escalas ou técnicas estatísticas não supre a necessidade da descoberta de fatores que possam auxiliar na diferenciação dos quadros. Estudos de diferenças na neurobiologia entre os transtornos são escassos. Especificadores genéticos, neuropsicológicos, bioquímicos, neuroanatômicos, ou até a resposta aos psicofármacos podem também indicar as vias ou áreas cerebrais que podem estar alteradas, orientando a criação de terapêuticas específicas para os transtornos. Nas próximas páginas, serão revisados os estudos que avaliaram fatores genéticos no THB e TDAH na infância e adolescência.

#### 2.4 Papel da Genética nos estudos para a diferenciação do THB e TDAH

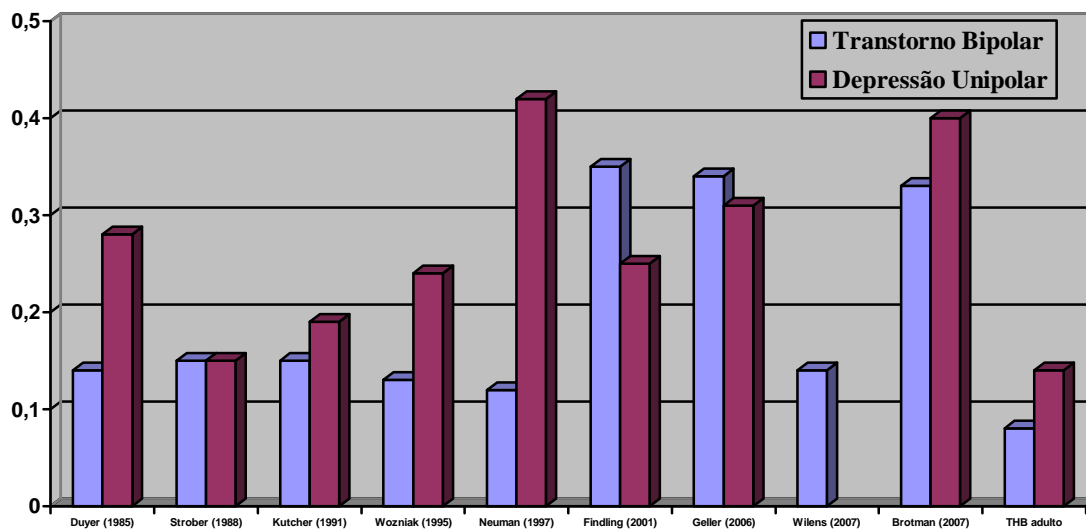
Atualmente, acredita-se que tanto fatores hereditários quanto ambientais tenham papel na etiologia dos transtornos mentais, pois não foi identificado um agente causal isolado. Dentre os fatores etiológicos estudados, o mais investigado foi a influência hereditária, após a constatação de maior agrupamento familiar dos transtornos mentais.

##### Estudos familiares

Os primeiros estudos, entre 1929 e 1954, já demonstravam que familiares de pacientes com transtornos de humor apresentavam uma prevalência de transtornos de humor maior que a da população em geral (Tsuang e Faraone, 1990). Quando foram avaliados familiares de crianças e/ou adolescentes com THB, o risco foi mais alto do que nos estudos em adultos, como demonstrado na Figura 1 (Faraone et al., 2003; Mick et al., 2009a; Brotman et al., 2007; Wilens et al., 2007; Findling et al., 2001; Dwyer et al., 1987; Kutcher et al., 1991; Neuman et al., 1997). A presença de uma maior agregação

familiar nos casos de THB em crianças e adolescentes sugere que esse grupo seja particularmente informativo para estudos genéticos.

Figura 1. Risco de Transtorno Bipolar e Depressão em Familiares de Crianças e Adolescentes com Transtorno de Humor Bipolar



### Estudos Moleculares

Tem por objetivo localizar a posição de um locus responsável por um transtorno específico. Em um estudo de mapeamento genético, um polimorfismo, cuja localização cromossômica é conhecida, é usado para encontrar o gene que confere suscetibilidade.

Dois métodos são usados: os estudos de varredura genômica (onde o genoma é escaneado na íntegra), e os estudos de genes candidatos: neste, os genes são estudados de acordo com sua possível relação com os modelos de neurobiologia, de resposta a fármacos, e também por modelos animais da doença.

Os estudos de associação comparam a frequência dos alelos de genes específicos nos indivíduos afetados e os indivíduos controles, pareados para outras variáveis relevantes (Arisoy et al., 2009). Esses estudos são usados quando não observamos grande recorrência familiar da doença e a maior parte dos casos é dita isolada, seguindo um desenho do tipo “caso-controle” (Bird et al., 2001).

#### Estudos de associação com genes candidatos

Há pouco mais de uma década que os estudos de associação com genes candidatos vem sendo realizados em famílias de crianças e adolescentes com transtorno bipolar.

No primeiro estudo conduzido com uma amostra específica de crianças e adolescentes com THB (n=46 trios), não foi encontrada transmissão preferencial dos alelos curto/longo do gene codificador para o transportador da serotonina (5HTTLPR) (Geller e Cook, 1999). Também há achados negativos nos genes da catecol-O-metiltransferase –COMT, AVPR1A (arginina-vasopressina), genes do receptor órfão relacionado ao RAR (RORA) e beta (RORB) (Geller e Cook, 2000; Geller et al., 2005; McGrath et al., 2009). Os achados dos dois principais grupos que investigaram os fatores genéticos no THBIA foram agrupados e apresentados na Tabela 1.

O primeiro resultado positivo foi publicado em 2004 (Geller et al., 2004b). Em 53 crianças e adolescentes com THB, foi detectada a transmissão preferencial do alelo Val66 no polimorfismo Val66Met do gene do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro - Brain-Derived Neurotrophic Factor – BDNF, no cromossomo 11p13 - rs6265G > A. O polimorfismo funcional val66met afeta o empacotamento intracelular do BDNF, assim

como a sua atividade secreção-dependente. Sua função será descrita em detalhes posteriormente.

Após este primeiro resultado positivo, também foram publicadas transmissão preferencial do alelo A do GAD1 (sem interação com o Val66 BDNF), e associação do JBD com o rs40184 no gene do transportador da dopamina (Geller et al., 2008; Mick et al., 2008).

Este grupo de investigadores também tentou replicar os achados das pesquisas genéticas de associação anteriores, porém não teve resultados na mesma direção (Mick et al., 2009a; Mick et al., 2009b). Além disso, quando as amostras foram combinadas, o valor da associação inicial deixou de ser significativo. É importante salientar uma diferença entre as amostras: o fenótipo proposto pelo grupo de Barbara Geller abrange apenas crianças e adolescentes que apresentem sintomas cardinais de euforia e grandiosidade, enquanto o fenótipo estudado pelo grupo de Boston (estudos de Mick e McGrath) apresenta também irritabilidade como sintoma cardinal. Mesmo ambos grupos tendo delimitado que seria avaliado apenas THB do tipo I, são amostras bastante diferentes. Cerca de 85% dos pacientes do grupo da Harvard também apresentam a comorbidade com TDAH.

Para o esclarecimento do papel dos fatores genéticos no estabelecimento dos quadros, será indispensável replicação dos estudos anteriores fazendo uma comparação direta entre os grupos de pacientes com THB, THB em comorbidade com TDAH e TDAH. Tal comparação é extremamente difícil na prática devido às altas taxas de comorbidade.



Tabela 1. Resultados dos estudos de associação com genes candidatos para o THBIA

Gene	Polimorfismo	Alelo	WASH-U			Harvard/MGH			Resultados combinados		
			T:U	OR (95% CI)	p	T:U	OR (95% CI)	p	T:U	OR (95% CI)	p
COMT	Val158Met	COMT-1*	23:28	0.82 (0.47–1.42)	0.48	85:67	1.27 (0.92–1.75)	0.14	108:95	1.14 (0.86–1.50)	0.74
BDNF	Val66Met	Val66*	21:9	2.3 (1.09–4.98)	0.01	43:35	1.23 (0.79–1.92)	0.37	64:44	1.45 (0.99–2.13)	0.12
SLC6A4	HTTLPR	Short*	26:25	1.04 (0.60–1.80)	0.89	73:84	0.87 (0.63–1.19)	0.38	99:109	0.91 (0.69–1.19)	0.85
SLC6A3	rs41084	T	-	-	-	103:68	1.51 (1.12–2.05)	0.03	-	-	-
GAD1	rs2241165	A	29:14	2.07 (1.11–3.87)	0.02	-	-	-	-	-	-

Legenda: OR (95% CI), razão de chances e intervalos de confiança de 95% a partir do TDT; T:U, contagem de transmitidos: não-transmitidos (untransmitted) dos Testes de Desequilíbrio de Transmissão.

\* COMT-1 Low activity allele (alelo de baixa atividade - Met158: alelo A no rs4680); Val66 (alelo G no rs6265); Curto (alelo de 14 repetições).

No TDAH, os estudos de transmissão familiar, de gêmeos e de adoção indicam um importante papel de componentes genéticos na etiologia do transtorno. O conjunto dos estudos atuais sugerem que sua herdabilidade é de 0.78 (Rohde et al., 2004; Faraone et al., 2005). A hipótese atual é que diversos genes de pequeno tamanho de efeito confirmam uma vulnerabilidade biológica ao indivíduo, e que essa vulnerabilidade somada a estressores ambientais parecem ocasionar o estabelecimento da doença (Smalley et al., 1997 Faraone et al., 2005).

Quando avaliamos os genes que já foram estudados em THB e TDAH na infância e adolescência, observamos que não há estudos que foquem na comorbidade ou na diferenciação entre os dois transtornos.

Partindo dos achados positivos em THBIA, localizamos na literatura os seguintes estudos:

- Gene do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF): Há diversos estudos que avaliam a associação entre genes do BDNF e o TDAH (para uma revisão, ver Gizer et al., 2009; Forero et al., 2009). Uma metanálise agrupou 12 estudos do SNP rs6265 (Val66Met) do BDNF. Não detectou resultados significativos quando as amostras foram agrupadas (Forero et a., 2009).

- Gene da GAD1: Não foram encontrados estudos em TDAH.

- Gene do transportador da dopamina (SLC6A3, DAT1):

- rs40184: Quatro estudos com pacientes com TDAH, incluindo um de nosso grupo (Genro et al., 2008). Baseando-nos no primeiro estudo realizado, o alelo “G” foi considerado o de risco. Na metanálise com modelo efeito fixo, foi identificada uma

tendência de associação modesta entre este alelo e o TDAH (OR = 1.10, 95% CI = 0.99–1.21,  $\chi^2=3.25$ , P = 0.036), e a heterogeneidade não foi significativa (Gizer et al., 2009).

Neste trabalho, teremos como foco o gene do BDNF, dados o resultado positivo encontrado anteriormente nos pacientes com THB e os achados negativos no TDAH, assim como pelo seu potencial papel na neurobiologia desses transtornos, que passaremos a apresentar.

## 2.5 Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (Brain-Derived Neurotrophic Factor – BDNF)

O BDNF é uma molécula da classe das neurotrofinas ligada à plasticidade neuronal, ou seja, promove a diferenciação e a sobrevivência neuronal durante o desenvolvimento e na vida adulta. O BDNF está associado aos processos de memória e cognição, devido à sua participação na neurogênese no hipocampo (que também é uma região envolvida na patogênese dos transtornos de humor), à resposta aos antidepressivos e ao carbonato de lítio (Cowansage et al., 2010; Hashimoto et al., 2004; Neves-Pereira et al., 2002; Skibinska et al., 2004).

Conforme relatado anteriormente, alguns estudos demonstram associação significativa entre um polimorfismo funcional do gene BDNF (rs6265) e THB em adultos com idade de início precoce, ou mesmo em uma amostra de crianças e adolescentes com THB (Strauss et al., 2004; Geller et al., 2004b). A substituição neste SNP no nucleotídeo 196 (seqüência G/A), causado pela substituição de valina para metionina no códon 66 do

polimorfismo Val66Met, altera o trânsito e empacotamento celular do proBDNF e, conseqüentemente, a secreção do peptídeo maduro (Lang et al., 2009).

Os fatores neurotróficos podem modificar a sinalização glutamatérgica diretamente, mudando a expressão das subunidades receptoras de glutamato e das proteínas reguladoras do  $Ca^{++}$  e, também, indiretamente induzindo a produção de enzimas antioxidativas, proteínas reguladoras de energia e membros das famílias anti-apoptóicas Bcl2. A ativação excessiva dos receptores do glutamato, sob condições de estresse metabólico e oxidativo, pode contribuir para a disfunção neuronal que é observada nos transtornos psiquiátricos (Kacpzinski et al., 2011; Mattson, 2008).

Por outro lado, o aumento da sinalização dos fatores neurotróficos pode otimizar a sinalização glutamatérgica, exercendo efeito neuroprotetor por meio de fatores ambientais como exercício físico e restrição por dieta, assim como substâncias químicas (antidepressivos, anticonvulsivantes e outros) (Mattson, 2008).

A interação gene-ambiente foi examinada em um trabalho que abordou a interface entre o polimorfismo Val66Met do gene do BDNF e eventos de vida estressores em adultos com THB. (n=1085, 487 pacientes com THB-I e 598 controles sem transtornos mentais) (Hosang et al., 2010). O alelo Met foi significativamente associado ao THB. Os casos de THB relataram mais eventos de vida estressores antes de episódios depressivos ou maníacos que os controles nos 6 meses antes da entrevista, mas a interação entre a presença do alelo Met e eventos de vida estressores foi associada significativamente apenas aos piores episódios de depressão bipolar.

Somando-se os fatores: papel fisiológico do BDNF na neuroplasticidade, sua diminuição em situações estressoras, seu aumento com o uso de timolépticos e os

achados positivos dos estudos anteriores, (mesmo que necessitem ser replicados) conclui-se que o BDNF pode ter um papel importante na gênese e curso das doenças mentais, e deve ser mais estudado. Estes estudos podem ser muito importantes no entendimento da neurobiologia dos transtornos, sobretudo quando falamos de crianças e adolescentes, cujas vias cerebrais ainda estão em desenvolvimento.

## 2.6 Níveis Periféricos de BDNF e sua Relação com THB e TDAH

O gene do BDNF codifica uma proteína cujo papel também vem sendo estudado no Transtorno Bipolar. O BDNF é a neurotrofina mais abundante no cérebro, altamente expressada no córtex cerebral e no hipocampo, áreas ligadas à regulação da memória e das emoções (Dias et al., 2009).

Os níveis periféricos de BDNF apresentam correlação com seu nível cerebral, e os achados atuais indicam que ele pode ser um marcador de atividade de doença. Há inúmeros achados em estudos com adultos com THB. O BDNF periférico apresentou-se alterado em adultos com THB que se apresentavam em episódios afetivos (Machado-Vieira et al., 2007; Karege et al., 2002; Cunha et al., 2006; Hashimoto et al., 2004; Oliveira et al., 2009). Outros estudos mostram que há aumento nos níveis séricos de BDNF com o tratamento (Palomino et al., 2006; Tramontina et al., 2009). Achados na mesma direção mostram que pacientes com múltiplos episódios apresentam níveis mais baixos de BDNF sérico que pacientes em seu primeiro episódio (Kauer-Sant'Anna et al., 2009).

Estes achados sugerem que o nível sérico do BDNF possa ser um marcador da resposta farmacológica, ou então, estar associado ao estado de humor. Também sugerem que os níveis de BDNF estejam mais ligados ao estado de humor que ao traço de doença. Alguns estudos avaliaram se havia relação entre o genótipo do polimorfismo Val66met do BDNF e o nível sérico (Tramontina et al., 2007b). Cento e sete pacientes com THB em eutímia foram comparados a 137 controles, e não foi detectada interação significativa entre o polimorfismo do BDNF (Val/Val versus portadores do alelo Met) e os níveis séricos de BDNF ( $p=0.34$ ), indicando que o polimorfismo não afeta os níveis séricos de BDNF, tanto em pacientes (mesmo com controle estatístico para sintomas de mania ou depressão) como em controles. Esse resultado é muito interessante, tendo em vista que os polimorfismos do BDNF estão ligados a uma maior ou menor atividade do sistema do BDNF. Mas os polimorfismos, pelo menos neste estudo, não foram responsáveis pelos níveis periféricos da proteína. Mas há dados controversos quanto ao papel do polimorfismo Val66Met e os níveis séricos do BDNF. Em um estudo com 114 sujeitos hígidos, foi detectada uma associação entre os indivíduos com o genótipo Val/Val do BDNF e níveis mais baixos de BDNF, quando comparados aos portadores do genótipo Val/Met (Lang et al., 2009).

Uma metanálise dos estudos dos níveis periféricos de BDNF publicada recentemente, compreendendo 13 estudos e 1113 indivíduos (entre pacientes e controles), concluiu que os níveis de BDNF estavam diminuídos tanto na mania quanto na depressão em adultos com THB, quando comparados a controles (Tamanho de efeito -0.81, 95% CI -1.11 a -0.52,  $p < 0.0001$  e Tamanho de Efeito -0.97, 95% CI -1.79 a -0.51,  $p = 0.02$ , respectivamente) (Fernandes et al., 2011). Os níveis de BDNF não eram diferentes em

pacientes com THB eutímicos, quando comparados a controles (Tamanho de efeito -0.20, 95% CI -0.61 a 0.21,  $p = 0.33$ ). A análise de meta-regressão demonstrou que a idade e a duração da doença influenciavam a variação do tamanho de efeito em pacientes eutímicos. Foi observado um aumento nos níveis de BDNF após o tratamento da mania aguda. (Tamanho de Efeito -0.63, 95% CI -1.11 a -0.15,  $p = 0.01$ ).

Quanto aos dados de crianças e adolescentes, os achados em indivíduos saudáveis são de que a concentração sérica do BDNF aumenta ao longo dos primeiros anos de vida, tem um pequeno pico ao redor dos 30 anos, e posteriormente diminui levemente ao longo da vida adulta (Katoh-Semba et al., 2007).

Até o momento, apenas um estudo avaliou os níveis séricos de BDNF em crianças e adolescentes com THB (Pandey et al., 2008). Nesse estudo, crianças e adolescentes com THB receberam tratamento por 8 semanas com estabilizadores de humor, e foram comparadas a controles pareados por sexo, idade e etnia ( $n=21$ ) antes do tratamento ( $n=26$ ) e depois do tratamento ( $n=19$ ). Foi determinado o nível de expressão de mRNA (RNA mensageiro) do BDNF nos linfócitos, nestes três grupos, e o nível plaquetário da proteína do BDNF foi aferido entre o grupo controle e o grupo de pacientes com THB antes do tratamento. Os pacientes apresentavam níveis plaquetários (que servem de depósito) de BDNF mais baixos que os controles, antes do tratamento. Os níveis de mRNA do BDNF estavam diminuídos nos linfócitos dos pacientes com THB em relação aos controles, mas após 8 semanas de tratamento com estabilizadores de humor (lítio, divalproato, risperidona ou aripiprazol), os níveis de mRNA de linfócitos (que produzem periféricamente o BDNF) nos pacientes com THB eram semelhantes aos dos controles. Não foi observada correlação entre os sintomas de mania ou depressão, mas sim, entre a

melhora nos sintomas de mania e os níveis de mRNA do BDNF. Cabe observar que os níveis plaquetários podem não representar os níveis cerebrais do BDNF, pois o BDNF plaquetário é captado do plasma, e também de linfócitos, células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos.

Trata-se de um achado altamente relevante, pois documenta o prejuízo causado pelo THB em crianças e adolescentes, que pode causar dano ao longo de todo o desenvolvimento do indivíduo. Também permite observar o quão fundamental é o tratamento, que neste grupo trouxe os níveis de BDNF para valores próximos ao de controles hígidos. Também é uma das primeiras evidências de fatores biológicos que podem ser marcadores do transtorno bipolar, tanto em termos de diagnóstico, como em termos prognósticos, apesar de que, para tanto, estes achados devem ser replicados em outras amostras.

No TDAH em crianças e adolescentes, apenas um estudo foi encontrado (Shim et al., 2008). Nessa investigação, foram comparados os níveis plasmáticos de BDNF em 41 pacientes com TDAH virgens de tratamento e 107 controles hígidos. Os níveis plasmáticos de BDNF dos pacientes com TDAH apresentaram-se significativamente aumentados em relação aos controles, e foi encontrada uma correlação entre os níveis plasmáticos de BDNF e erros por omissão em um teste que mede desatenção.

Não foram realizados até o momento pesquisas destes marcadores em populações brasileiras de crianças e adolescentes. É bastante reduzido o número de estudos em crianças e adolescentes, quando comparamos com as investigações em adultos. Devido ao início precoce, acredita-se que o THBIA possa ser uma forma mais orgânica e severa do THB, e pode ser extremamente útil para a identificação de fatores genéticos e



bioquímicos responsáveis pelo quadro. Esses fatores fazem fundamental a realização de estudos na infância e adolescência.

## 2.7 Tratamento do THB na Presença da Comorbidade com TDAH

Os medicamentos usados no tratamento do THB na infância e adolescência incluem principalmente dois tipos:

- \* os estabilizadores de humor (carbonato de lítio, valproato de sódio, carbamazepina, oxcarbazepina, topiramato, lamotrigina): são medicações utilizadas no tratamento de episódios maníacos, hipomaníacos ou mistos, e também na prevenção de novos episódios.

- \* os antipsicóticos atípicos (risperidona, olanzapina, ziprasidona, clozapina, aripiprazol): além de tratar os sintomas psicóticos (alucinações e delírios), são medicações usadas como estabilizadores de humor, no tratamento de episódios maníacos ou mistos, ou em quadros de maior agressividade e irritabilidade (Rohde et al., 2005).

Quanto ao TDAH, a farmacoterapia também é parte fundamental do tratamento. Os estudos demonstraram que os tratamentos medicamentosos isolados ou combinados com terapia comportamental são mais efetivos que os tratamentos psicossociais isolados (MTA, 1999). Há mais de 160 ensaios clínicos demonstrando a efetividade dos estimulantes, sendo que o único disponível no Brasil é o metilfenidato (MFD) (Spencer et al., 1996; Swanson et al., 1995; Greenhill et al., 2002). O MFD é o estimulante mais estudado e utilizado no tratamento do TDAH, apresentando na maior parte dos casos uma redução estatística e clinicamente significativa dos sintomas do TDAH, assim como

melhora do funcionamento dos pacientes em vários outros domínios (Greenhill et al., 2002).

A recomendação clínica atual para o tratamento da comorbidade de THB com TDAH é iniciar a estabilização do humor e, assim que se atingir a melhor estabilização possível dos sintomas do THB, se houver persistência de sintomas do TDAH, associar estimulantes. Entretanto, essa recomendação não é baseada em evidências científicas.

Apesar de existirem muitos estudos avaliando tratamentos para THB e para TDAH isoladamente, apenas dois ensaios clínicos randomizados e duplo-cegos foram realizados no tratamento de pacientes com a comorbidade (Scheffer et al. 2005, Findling et al. 2007).

O estudo pioneiro foi conduzido em duas fases: na primeira, 40 crianças e adolescentes com THB+TDAH receberam divalproato de sódio por 8 semanas. Aqueles que melhoraram dos sintomas maníacos, mas não melhoraram do TDAH, eram convidados para a segunda fase (n=30, idade entre 8 e 17 anos), na qual recebiam sais mistos de anfetamina (não disponíveis no Brasil) por 4 semanas em um estudo cruzado (Crossover). O grupo que recebeu os sais mistos de anfetamina teve uma melhora significativa dos sintomas de TDAH (de acordo com a Clinical Global Impression-Improvement, que mede a impressão clínica do entrevistador quando à mudança do quadro), e não houve mudanças importantes nos sintomas de THB (Scheffer et al., 2005). Os sais mistos de anfetamina foram considerados seguros, pois não houve desestabilização dos sintomas de THB. Salienta-se como limitação deste estudo a ausência de uma medida específica para os sintomas de TDAH.

Em um estudo mais recente, 16 crianças e adolescentes participaram de um ensaio clínico cruzado duplo-cego de 4 semanas usando metilfenidato ou placebo (Findling et al., 2007). Foi determinada a melhor semana-dose de resposta ao tratamento (5mg-10mg-15mg), e essa foi comparada à placebo. Os pacientes medicados apresentaram uma redução significativamente maior que os não medicados nos sintomas de TDAH e não houve diferença nos sintomas de mania (de acordo com a Young Mania Rating Scale) ou depressão (de acordo com a Children Depression Rating Scale-Revised). As limitações deste estudo foram o uso de medicações concomitantes, como benzodiazepínicos, e a inclusão de pacientes com THB-SOE, o que gera heterogeneidade significativa em um trabalho com reduzido tamanho amostral.

Um cuidado importante no diagnóstico e no tratamento da comorbidade é que há relatos sugerindo que o uso de estimulantes pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de mania e psicose (Koehler-Troy et al. 1986; Cherland e Fitzpatrick 1999). Entretanto, as pesquisas mais recentes não corroboram que estes relatos sejam o que ocorre mais frequentemente (Carlson et al. 1992; Biederman et al. 1999; Kowatch et al. 2003; Pavuluri et al. 2004). Como relatado nos parágrafos anteriores, tanto no estudo de Scheffer et al. (2005) quanto no estudo de Findling et al. (2007), não houve piora significativa do humor após a instituição dos estimulantes.

Devido às altas taxas de comorbidade entre os grupos, à maior gravidade do quadro, ao pior desfecho clínico e à escassez de estudos, investigações adicionais são necessárias para elucidar o efeito dos psicoestimulantes em pacientes que possuem a comorbidade entre THB e TDAH, tanto em relação à resposta ao tratamento dos sintomas do TDAH neste grupo, quanto ao efeito nos sintomas de humor.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

O presente estudo visa avaliar o papel do BDNF na diferenciação neurobiológica entre TDAH e THB e a resposta ao tratamento na presença da comorbidade em uma amostra clínica de crianças e adolescentes brasileiros de 6 a 17 anos.

### **Objetivos específicos**

- a) Avaliar se há transmissão preferencial do alelo Val66 do BDNF no THB e no TDAH;
- b) Avaliar se há diferença entre os níveis séricos do BDNF em pacientes com TDAH, e com THB em comorbidade com TDAH.
- c) Avaliar a resposta ao tratamento com estimulantes, em pacientes que apresentam a comorbidade entre THB e TDAH, já estabilizados em seus sintomas de humor;

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed. Washington (DC), American Psychiatric Press, 1994.

Arisoy O, Oral ET. Genetic studies of bipolar disorder: a review. Turk Psikiyatri Derg. 2009;20:282-93.

Axelson D, Birmaher B, Strober M, Gill MK, Valeri S, Chiappetta L, Ryan N, Leonard H, Hunt J, Iyengar S, Bridge J, Keller M. Phenomenology of children and adolescents with bipolar spectrum disorders. Arch Gen Psychiatry. 2006;63:1139-48.

Barkley RA. Major life activity and health outcomes associated with attention-deficit/hyperactivity disorder. J Clin Psychiatry. 2002;63:10-5.

Biederman J, Newcorn J, Sprich S. Comorbidity of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder With Conduct, Depressive, Anxiety, and Other Disorders. Am J Psychiatry. 1991;148:564-77.

Biederman J, Wozniak J, Kiely K, Ablon S, Faraone S, Mick E, Mundy E, Kraus I. CBCL clinical scales discriminate pre-pubertal children with structured interview-derived diagnosis of mania from those with ADHD. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry. 1995;34:464-71.

Biederman J, Mick E, Prince J, Bostic JQ, Wilens TE, Spencer T, et al. Systematic chart review of the pharmacologic treatment of comorbid attention deficit hyperactivity disorder in youth with bipolar disorder. J Child Adolesc Psychopharmacol. 1999; 9:247-56.

Bird, T. D., Jarvik, G. P., Wood, N. W. Genetic association studies: genes in search of diseases. *Neurology* 2001; 57:1153-54.

Biederman J, Faraone SV, Wozniak J, Mick E, Kwon A, Aleardi M. Further evidence of unique developmental phenotypic correlates of pediatric bipolar disorder: findings from a large sample of clinically referred preadolescent children assessed over the last 7 years. *J Affect Disord.* 2004;82:S45- S58.

Biederman J. Attention-deficit/hyperactivity disorder: a selective overview. *Biol Psychiatry* 2005;57:1215-20.

Birmaher B, Axelson D. Course and outcome of bipolar spectrum disorder in children and adolescents: a review of the existing literature. *Dev Psychopathol.* 2006;18:1023-35.

Brotman MA, Kassem L, Reising MM, Guyer AE, Dickstein DP, Rich BA, et al. Parental diagnoses in youth with narrow phenotype bipolar disorder or severe mood dysregulation. *Am J Psychiatry.* 2007;164:1238-41.

Campbell JD. Manic-depressive disease in children. *J Am Med Assoc.* 1955;158:154-7.

Carlson GA, Rapport MD, Kelly KL, Pataki CS: The effects of methylphenidate and lithium on attention and activity level. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 1992;31:262-70.

Carlson GA, Kelly KL. Manic symptoms in psychiatrically hospitalized children-what do they mean? *J Affect Disord.* 1998;51:123-35.

Carlson GA, Bromet EJ, Driessens C, Mojtabai R, Schwartz JE. Age at onset, childhood psychopathology, and 2-year outcome in psychotic bipolar disorder. *Am J Psychiatry.* 2002;159:307-9.

Carlson GA, Jensen PS, Findling RL, Meyer RE, Calabrese J, DelBello MP, et al. Methodological Issues and Clinical Trials with Child and Adolescent Patients with Bipolar Disorder: Report of a Consensus Conference. *J Child Adolesc Psychopharmacol.* 2003;13:1-15.

Cherland E, Fitzpatrick R. Psychotic side effects of psychostimulants: A 5-year review. *Can J Psychiatry.* 1999; 44:811-3.

Consoli A, Bouzamondo A, Guilé JM, Lechat P, Cohen D. Comorbidity with ADHD decreases response to pharmacotherapy in children and adolescents with acute mania: evidence from a metaanalysis. *Can J Psychiatry.* 2007; 52:323-8.

Cowansage KK, LeDoux JE, Monfils MH. Brain-derived neurotrophic factor: a dynamic gatekeeper of neural plasticity. *Curr Mol Pharmacol.* 2010;3:12-29.

Craney JL, Geller B. A prepubertal and early adolescent bipolar disorder-I phenotype: review of phenomenology and longitudinal course. *Bipolar Disord.* 2003;5:243-56.

Cunha AB, Frey BN, Andreazza AC, Goi JD, Rosa AR, Goncalves CA, et al. Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. *Neurosci Lett.* 2006;398:215-9.

de Oliveira GS, Ceresér KM, Fernandes BS, Kauer-Sant'Anna M, Fries GR, Stertz L, et al. Decreased brain-derived neurotrophic factor in medicated and drug-free bipolar patients. *J Psychiatr Res.* 2009;43:1171-4.

Dias VV, Brissos S, Frey BN, Andreazza AC, Cardoso C, Kapczinski F. Cognitive function and serum levels of brain-derived neurotrophic factor in patients with bipolar disorder. *Bipolar Disord.* 2009;11:663-71.

Dwyer JT, DeLong GR. A family history study of twenty probands with child-hood manic-depressive illness. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1987;26:176–80.

Faraone SV, Glatt SJ, Tsuang MT. The genetics of pediatric-onset bipolar disorder. *Biol Psychiatry*. 2003;53:970-7.

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

Fernandes BS, Gama CS, Maria Ceresér K, Yatham LN, Fries GR, Colpo G, et al. Brain-derived neurotrophic factor as a state-marker of mood episodes in bipolar disorders: A systematic review and meta-regression analysis. *J Psychiatr Res*. 2011;45: 995-1004.

Findling RL, Gracious BL, McNamara NK, Youngstrom EA, Demeter CA, Calabrese JR. Rapid, continuous cycling and psychiatric co-morbidity in pediatric bipolar I disorder. *Bipolar Disord*. 2001;3:202-10.

Findling RL, Short EJ, McNamara NK, Demeter CA, Stansbrey RJ, Gracious BL, et al. Methylphenidate in the treatment of children and adolescents with bipolar disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2007;46:1445-53.

Forero DA, Arboleda GH, Vasquez R, Arboleda H. Candidate genes involved in neural plasticity and the risk for attention-deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis of 8 common variants. *J Psychiatry Neurosci*. 2009;34:361-6.

Galanter CA, Leibenluft E. Frontiers between Attention Deficit Hyperactivity Disorder and Bipolar Disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*. 2008;17:325-46.



Geller B, Williams M, Zimmerman B, Frazier J, Beringer L, Warner KL. Prepubertal and early adolescent bipolarity differentiate from ADHD by manic symptoms, grandiose, delusions, ultra-rapid or ultradian cycling. *J Affect Disord.* 1998;51:81-91.

Geller B, Cook E. Serotonin transporter gene (HTTLPR) is not in linkage disequilibrium with prepubertal and early adolescent bipolarity. *Biol Psychiatry.* 1999;45:1230-3.

Geller B, Bolhofner K, Craney J, Williams M, DelBello M, Gundersen K. Psychosocial functioning in a prepubertal and early adolescent bipolar disorder phenotype. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2000a;39:1543-8.

Geller B, Cook EH Jr. Ultradian rapid cycling in prepubertal and early adolescent bipolarity is not in transmission disequilibrium with val/met COMT alleles. *Biol Psychiatry.* 2000b;47:605-9.

Geller B, Zimmerman B, Williams M, Delbello MP, Bolhofner K, Craney JL, et al. DSM-IV mania symptoms in a prepubertal and early adolescent bipolar disorder phenotype compared to attention – deficit hyperactive and normal controls. *J Child Adolesc Psychopharmacol.* 2002;12:11-25.

Geller B, Tillman R, Craney J, Bolhofner K. Four-year prospective outcome and natural history of mania in children with a prepubertal and early adolescent bipolar disorder phenotype. *Arch Gen Psychiatry.* 2004a;61:459-67.

Geller B, Badner JA, Tillman R, Christian SL, Bolhofner K, Cook EH. Linkage disequilibrium of the brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism in children with a prepubertal and early adolescent bipolar disorder phenotype. *Am J Psychiatry.* 2004b;161:1698-1700.

Geller B, Tillman R, Badner JA, Cook EH Jr. Are the arginine vasopressin V1a receptor microsatellites related to hypersexuality in children with a prepubertal and early adolescent bipolar disorder phenotype? *Bipolar Disord.* 2005;7:610-6.

Geller B, Tillman R, Bolhofner K, Hennessy K, Cook EH Jr. GAD1 single nucleotide polymorphism is in linkage disequilibrium with a child bipolar I disorder phenotype. *J Child Adolesc Psychopharmacol.* 2008;18:25–9.

Genro JP, Polanczyk GV, Zeni C, Oliveira AS, Roman T, Rohde LA, Hutz MH. A common haplotype at the dopamine transporter gene 5' region is associated with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2008;147B:1568-75.

Gizer IR, Ficks C, Waldman ID. Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet.* 2009;126:51-90.

Goodwin FK, Jamison KR. *Manic depressive illness.* Oxford, England: Oxford University Press, Inc; 1990.

Greenhill LL, Pliszka S, Dulcan MK, Bernet W, Arnold V, Beitchman J, et al. Practice Parameter for the use of stimulant medications in the treatment of children, adolescents, and adults. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2002;41:26S-49S.

Hashimoto K, Shimizu E, Iyo M. Critical role for brain derived neurotrophic factor in mood disorders. *Brain Res Rev.* 2004;45:104 –14.

Hosang GM, Uher R, Keers R, Cohen-Woods S, Craig I, Korszun A, Perry J, et al. Stressful life events and the brain-derived neurotrophic factor gene in bipolar disorder. *J Affect Disord.* 2010;125:345-9.

<http://www.censo2010.ibge.gov.br/index.php>

<http://www.dsm5.org/proposedrevisions/pages/proposedrevision.aspx?rid=397>

Jaideep T, Reddy YC, Srinath S. Comorbidity of attention deficit hyperactivity disorder in juvenile bipolar disorder. *Bipolar Disord.* 2006;8:182–7.

Kafantaris V, Coletti DJ, Dicker R, Padula G, Kane JM. Lithium treatment of acute mania in adolescents: a large open trial. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2003;42:1038-45.

Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Teixeira AL, Magalhaes PV, Kauer-Sant'Anna M, Klamt F, et al. Peripheral biomarkers and illness activity in bipolar disorder. *J Psychiatr Res.* 2011;45:156-61.

Karege F, Ferret G, Bondolfi G, Schwald M, Bertschy G, Aubry JM. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res.* 2002;109:143–8.

Kato T. Molecular genetics of bipolar disorder and depression. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2007;61:3-19.

Katoh-Semba R, Wakako R, Komori T, Shigemi H, Miyazaki N, Ito H, et al. Age-related changes in BDNF protein levels in human serum: differences between autism cases and normal controls. *Int J Dev Neurosci.* 2007;25:367-72.

Kauer-Sant'Anna M, Kapczinski F, Andreazza AC, Bond DJ, Lam RW, Young LT, Yatham LN. Brain-derived neurotrophic factor and inflammatory markers in patients with early- vs. late-stage bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2009;12:447-58.

Kent L, Craddock N. Is there a relationship between attention deficit hyperactivity disorder and bipolar disorder? *J Affect Disord.* 2003;73:211-21.

Koehler-Troy C, Strober M, Malenbaum R: Methylphenidate-induced mania in a prepubertal child. *J Clin Psychiatry*. 1986;47:566–7.

Kowatch RA, Sethuraman G, Hume JH, Kromelis M, Weinberg WA. Combination pharmacotherapy in children and adolescents with bipolar disorder. *Biol Psychiatry*. 2003;53:978–84.

Kowatch RA, Youngstrom EA, Danielyan A, Findling RL: Review and meta-analysis of the phenomenology and clinical characteristics of mania in children and adolescents. *Bipolar Disord*. 2005;7:483-96.

Kraepelin E. Mixed States. In: Kraepelin E. *Manic-depressive insanity & paranoia*. Edinburgh: E & S Livingston Ltd; 1921.

Krieger FV, Pheula GF, Coelho RPS, Zeni TA, Tramontina S, Zeni CP, Rohde LA. An Open-Label Trial of Risperidone in Children and Adolescents with Severe Mood Dysregulation. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*. 2011:237-43.

Kutcher S, Marton P. Affective disorders in first-degree relatives of adolescent onset bipolars, unipolars, and normal controls. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1991;30:75–8.

LaGrone DM. Manic-depressive illness in early childhood: the case of Christopher. *South Med J*. 1981;74:479-81.

Lang UE, Hellweg R, Sander T, Gallinat J. The Met allele of the BDNF Val66Met polymorphism is associated with increased BDNF serum concentrations. *Mol Psychiatry*. 2009;14:120-2.

Leibenluft E, Charney DS, Towbin KE, Bhangoo RK, Pine DS. Defining clinical phenotypes of juvenile mania. *Am J Psychiatry*. 2003;160:430–7.

Machado-Vieira R, Dietrich MO, Leke R, Cereser VH, Zanatto V, Kapczinski F, Souza DO, Portela LV, Gentil V. Decreased plasma brain derived neurotrophic factor levels in unmedicated bipolar patients during manic episode. *Biol Psychiatry*. 2007;61:142-4.

Mattson MP. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1144:97-112.

McClellan J, Kowatch R, Findling RL: Practice Parameter for the Assessment and Treatment of Children and Adolescents With Bipolar Disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2007. 46:107-25.

McGrath CL, Glatt SJ, Sklar P, Le-Niculescu H, Kuczenski R, Doyle AE, et al. Evidence for genetic association of RORB with bipolar disorder. *BMC Psychiatry*. 2009;9:70.

Merikangas KR, Akiskal HS, Angst J, Greenberg PE, Hirschfeld RM, Petukhova M, Kessler RC. Lifetime and 12-month prevalence of bipolar spectrum disorder in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiat*. 2007;64:543-52.

Mick E, Kim JW, Biederman J, Wozniak J, Wilens T, Spencer T, et al. Family based association study of pediatric bipolar disorder and the dopamine transporter gene (SLC6A3). *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008;147B:1182–5.

Mick E, Faraone SV. Family and genetic association studies of bipolar disorder in children. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*. 2009a;18:441-53.

Mick E, Wozniak J, Wilens TE, Biederman J, Faraone SV. Family-based association study of the BDNF, COMT and serotonin transporter genes and DSM-IV bipolar-I disorder in children. *BMC Psychiatry*. 2009b;9:2.

Milberger S, Biederman J, Faraone SV, Murphy J, Tsuang MT. Attention deficit hyperactivity disorder and comorbid disorders: issues of overlapping symptoms. *Am J Psychiatry*. 1995;152:1793-9.

Moreno C, Laje G, Blanco C, Jiang H, Schmidt AB, Olfson M. National trends in the outpatient diagnosis and treatment of bipolar disorder in youth. *Arch Gen Psychiatry*. 2007;64:1032-9.

Neuman RJ, Geller B, Rice JP, Todd RD. Increased prevalence and earlier onset of mood disorders among relatives of prepubertal versus adult probands. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1997;36:466–73.

Neves-Pereira M, Mundo E, Muglia P, King N, Macciardi F, Kennedy JL. The brain-derived neurotrophic factor gene confers susceptibility to bipolar disorder: evidence from a family-based association study. *Am J Hum Genet*. 2002;71: 651-5.

Palomino A, Vallejo-Illarramendi A, González-Pinto A, Aldama A, González-Gómez C, Mosquera F, et al. Decreased levels of plasma BDNF in first-episode schizophrenia and bipolar disorder patients. *Schizophr Res*. 2006;86:321-2.

Pandey GN, Rizavi HS, Dwivedi Y, Pavuluri MN. Brain-derived neurotrophic factor gene expression in pediatric bipolar disorder: effects of treatment and clinical response. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2008;47:1077-85.

Pavuluri MN, Henry DB, Devineni B, Carbray JA, Naylor MW, Janicak PG. A pharmacotherapy algorithm for stabilization and maintenance of pediatric bipolar disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2004;43:859-67.

Pavuluri MN, Birmaher B, Naylor MW. Pediatric bipolar disorder: a review of the past 10 years. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2005;44:846-71.

Petresco S, Zeni CP, Tramontina S. Infância e Adolescência. In: Ricardo Alberto Moreno; Doris Hupfeld Moreno, editors. Da psicose maníaco-depressiva ao espectro bipolar. São Paulo; 2008. p481-500.

Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, Biederman J, Rohde LA. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry*. 2007;164:942-8.

Post RM, Chang KD, Findling RL, Geller B, Kowatch RA, Kutcher SP, Leverich GS. Prepubertal bipolar I disorder and bipolar disorder NOS are separable from ADHD. *J Clin Psychiatry*. 2004; 65:898-902.

Rohde LA, Ketzner C. Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade. In: Fichtner N, editor. Transtornos mentais na infância e adolescência. Porto Alegre: Editora Artes Médicas; 1997. p106-19.

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

Rohde LA, Halpern R. Recent advances on attention deficit/hyperactivity disorder. *J Pediatr (Rio J)*. 2004;80:S61-70.

Rohde LA, Tramontina S. O tratamento farmacológico do transtorno bipolar na infância e adolescência. *Rev. Psiquiatr. Clín*. 2005;32:117-27.

Scheffer RE, Kowatch RA, Carmody T, Rush AJ. Randomized, placebo-controlled trial of mixed amphetamine salts for symptoms of comorbid ADHD in pediatric bipolar

disorder after mood stabilization with divalproex sodium. *Am J Psychiatry*. 2005;162:58-64.

Schürhoff F, Bellivier F, Jouvent R, Mouren-Siméoni MC, Bouvard M, Allilaire JF, Leboyer M. Early and late onset bipolar disorders: two different forms of manic-depressive illness? *J Affect Disord*. 2000;58:215-21.

Shim SH, Hwangbo Y, Kwon YJ, Jeong HY, Lee BH, Lee HJ, Kim YK. Increased levels of plasma brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in children with attention deficit-hyperactivity disorder (ADHD). *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008;32:1824-8.

Skibinska M, Hauser J, Czerski PM, Leszczyńska-Rodziewicz A, Kosmowska M, Kapelski P, et al. Association Analysis of brain-derived neurotrophic factor gene val66met polymorphism in schizophrenia and bipolar disorder. *World J Biol Psychiatry*. 2004;5:215-20.

Smalley SL. Genetic influences in childhood-onset psychiatric disorders: autism and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Hum Genet*. 1997;60:1276-82.

Spencer T, Biederman J, Wilens T, Harding M, O'Donnell D, Griffin S. Pharmacotherapy of attention-deficit/hyperactivity disorder across the life cycle. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1996;35:409-28.

Strauss J, Barr CL, George CJ, King N, Shaikh S, Devlin B, et al. Association study of brain-derived neurotrophic factor in adults with a history of childhood onset mood disorder. *Am J Med Genet*. 2004;131b:16-9.



Strober M, DeAntonio M, Schmidt-Lackner S, Freeman R, Lampert C, Diamond J. Early childhood attention deficit hyperactivity disorder predicts poorer response to acute lithium therapy in adolescent mania. *J Affect Disord.* 1998;51:145-51.

Swanson J, Lerner M, Williams L. More frequent diagnosis of attention deficit-hyperactivity disorder. *N Engl J Med.* 1995;333:944.

The MTA Cooperative Group. A 14-month randomized clinical trial of treatment strategies for attention-deficit/hyperactivity disorder. Multimodal Treatment Study of Children with ADHD. *Arch Gen Psychiatry.* 1999;56:1073-86.

Tramontina S, Schmitz M, Polanczyk G, Rohde LA. Juvenile bipolar disorder in Brazil: clinical and treatment findings. *Biol Psychiatry.* 2003;53:1043-9.

Tramontina S, Zeni CP, Rohde LA. Juvenile Bipolar Disorder in Brazil and South América. In: Diler RS, editor. *Pediatric Bipolar Disorder: a Global Perspective.* Pittsburgh: Nova Science Publishers; 2007a.

Tramontina J, Frey BN, Andreazza AC, Zandona M, Santin A, Kapczinski F. Val66met polymorphism and serum brain-derived neurotrophic factor levels in bipolar disorder. *Molecular Psychiatry.* 2007b;12, p230-1.

Tramontina J, Andreazza AC, Kauer-Sant'Anna M, Stertz L, Goi J, Chiarani F, Kapczinski, F. Brain-derived neurotrophic factor serum levels before and after treatment for acute mania. *Neuroscience Letters.* 2009;452:111–3.

Tsuang MT, Faraone SV. *The Genetics of Mood Disorders.* Baltimore: The John Hopkins University Press; 1990.

Weller EB, Weller RA, Fristad MA. Bipolar Disorder in Children: Misdiagnosis, Underdiagnosis, and Future Directions. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 1995;34:709-14.

Wilens TE, Biederman J, Spencer TJ. Attention deficit/hyperactivity disorder across the lifespan. *Annu Rev Med.* 2002;53:113-31.

Wilens TE, Biederman J, Adamson J, Monuteaux M, Henin A, Sgambati S, et al. Association of bipolar and substance use disorders in parents of adolescents with bipolar disorder. *Biol Psychiatry.* 2007;62:129-34.

Wozniak J, Biederman J, Kiely K, Ablon JS, Faraone SV, Mundy E, Mennin D. Mania-like symptoms suggestive of childhood-onset bipolar disorder in clinically referred children. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 1995;34:867-76.

Wozniak J, Biederman J. Childhood mania: insights into diagnostic and treatment issues. *J Assoc Acad Minor Phys.* 1997;8:78-84.

Zeni CP, Tramontina S, Caetano S, Kleinman A, Pheula G, Ketzer C, et al. Creation and Implementation of a Brazilian Bipolar Disorder Outpatient Program Network for Children and Adolescents. In preparation.

Zeni CP, Tramontina S. Capítulo XV. Doença bipolar em crianças e adolescentes. In: Dias VV, editor. (no prelo)

**ARTIGOS**

Artigo 1

Título em Português: BDNF no Transtorno de Humor Bipolar na Infância e Adolescência: Diferenciação por Meio dos Níveis Séricos, e o papel do Polimorfismo Val66Met

Título em Inglês: BDNF in Juvenile Bipolar Disorder and ADHD: differentiation using BDNF serum levels, and Val66Met Polymorphism

Artigo submetido para o Biological Psychiatry

**BDNF in Juvenile Bipolar Disorder and ADHD: differentiation using BDNF serum levels, and Val66Met Polymorphism**

Cristian Patrick Zeni<sup>1</sup>, Silzá Tramontina<sup>1</sup>, Bianca Wollenhaupt de Aguiar<sup>2</sup>, Angélica Salatino-Oliveira<sup>4</sup>, Gabriel Ferreira Pheula<sup>1</sup>, Henrique Tschoepke Ludwig<sup>1</sup>, Carlos Renato Moreira Maia<sup>3</sup>, Claudia Maciel Szobot<sup>3</sup>, Mara Hutz<sup>4</sup>, Flavio Pereira Kapczinski<sup>2</sup>, Luis Augusto Rohde<sup>1,3,5</sup>.

<sup>1</sup> Programa para Crianças e Adolescentes com Transtorno Bipolar (ProCAB), Child and Adolescent Psychiatry Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>2</sup> Bipolar Disorder Unit, Molecular Psychiatry Unit & National Institute for Translational Medicine, CNPq.

<sup>3</sup> ADHD Outpatient Program (PRODAH), Child and Adolescent Psychiatry Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>4</sup> Department of Genetics and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

<sup>5</sup> National Institute of Developmental Psychiatry for Children and Adolescents, Brazil.

**Corresponding author:** Dr. Cristian Patrick Zeni, Programa para Crianças e Adolescentes com Transtorno Bipolar – ProCAB, Serviço de Psiquiatria da Infância e Adolescência, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto

Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Zip code:90035-903. Tel/fax:+55-51-33598094. e-mail: [cpzeni@gmail.com](mailto:cpzeni@gmail.com)

Key words: Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF, Bipolar Disorder, Children, Adolescents, Mania

Number of words in abstract: 221    In article body (including Tables): 3480

Number of figures: 1; Number of tables: 2; Supplemental information: 0.

## Abstract

**Background:** Frontiers between Juvenile Bipolar Disorder (JBD) and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) are not well defined. Few studies have addressed potentially different neurobiological factors between the two disorders. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) has been increasingly recognized for its etiologic and prognostic role in adult BD studies. We assessed transmission of the Val66Met polymorphism at BDNF gene and BDNF serum levels in children and adolescents with BD comorbid with ADHD (BD+ADHD), ADHD alone, and healthy subjects.

**Methods:** children and adolescents were extensively assessed for psychiatric diagnoses by K-SADS-PL and clinical evaluation. The val66met polymorphism at BDNF was genotyped, and BDNF protein serum levels were measured in drug-free patients.

**Results:** No preferential transmission of the Val allele was observed in BD ( $n=66$ ;  $Z=0.52$   $p=0.60$ ) or ADHD ( $n=144$ ;  $Z=0.12$   $p=0.91$ ). In the ANCOVA, we detected a significant group effect (patients with BD+ADHD had higher serum levels than those with ADHD –  $F_{80,7}=4.09$ ,  $p=0.03$ ), after adjusting for severity (CGI) scores. We did not observe significant effects of the Val66Met polymorphism and any significant difference between both ADHD/BD groups and healthy controls on BDNF serum levels.

**Conclusions:** Although BDNF gene does not seem to play a significant role in differentiating children and adolescents with ADHD + BD from those with ADHD, BDNF serum levels deserve further attention in future research on neurobiological aspects of BD and ADHD.

## Introduction

Although the recognition of Juvenile Bipolar Disorder (JBD) has increased exponentially over the last years, it remains the most controversial diagnosis in child mental health due to challenges in its clinical characterization (1, 2). High comorbidity rates are found in JBD, especially with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD), ranging from 25-98% in clinical samples. The comorbidity determines worse functional outcome and even worse response to treatment (3, 4).

Clinical differentiation from ADHD is difficult because of symptom overlap, uncertainties about diagnostic criteria for BD in children, with high rates of interepisodic symptom, among others (5). Even the use of sophisticated assessment instruments or statistical techniques has not supplied sufficient evidence for differentiating these disorders (6).

In this context, one interesting approach to disentangle this dilemma may be the search for different neurobiological underpinnings between the disorders. In an fMRI study of cognitive control of emotion processing comparing children and adolescents with BD, ADHD and controls, the ADHD patients showed decreased ventrolateral prefrontal cortex engagement relative to both control and BD patients (7). Other pioneer studies have approached neuropsychological, neurological, brain structure and chemistry factors searching for differentiation in the neurobiological basis of these two disorders (8-11).

Advances in the understanding of the neurobiological complexities of BD have suggested a potential role of the Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in the etiology and course of BD (12). BDNF is the most widely distributed neurotrophin in the

central nervous system and participates in oxidative stress mechanisms, having many critical important biological functions including neuronal survival, differentiation, and synaptic plasticity (13, 14).

Genetic association studies in adults suggest an association between the Val66Met polymorphism at the BDNF gene and BD (15). In this SNP, a valine-to-methionine substitution at position 66 in the coding region (rs6265) reduces activity-dependent BDNF secretion through disruption in the BDNF-sortilin interaction. In JBD, Geller et al. (2004) observed a preferential transmission of the Val66 Allele in families of 53 children and adolescents with Bipolar Disorder (16). In ADHD, a meta-analytic investigation including eight studies did not detect a significant association with the Val66Met polymorphism (17).

Current research in adults with BD has demonstrated that BDNF protein serum levels (which are correlated to brain levels) are influenced by mood symptoms (18, 19). A pioneer study showed that BDNF protein serum levels are decreased in bipolar patients in depressive or manic episodes when compared to controls and to euthymic subjects with BD (20). A recent meta-analysis (n=1113 subjects from 13 studies) confirmed these results, including an increase of BDNF levels after mania treatment, and BDNF levels similar to control subjects in euthymic BD (19). We were able to find only one study investigating the association between BD and BDNF serum levels in children and adolescents (21). The mRNA levels of BDNF in lymphocytes of children and adolescents with BD (n=26) were significantly decreased compared with normal control subjects (n=21). After 8 weeks of treatment, subjects with BD presented a significant increase in mRNA BDNF levels, that became similar to controls. Platelet levels of BDNF were also



decreased in patients with JBD. One investigation addressed BDNF serum levels in children and adolescents with ADHD (n=41) and healthy controls (n=107) (22). Significantly higher BDNF plasma levels were observed in ADHD subjects. The studies reported in the literature on BDNF and BD/ADHD assessed only each condition against controls. No previous study assessed the role of BDNF in subjects with ADHD with or without comorbidity with BD.

Given the need for further understanding whether BDNF plays a role in differentiating the neurobiology of ADHD and ADHD comorbid with BD, we assessed samples of children and adolescents with these two diagnostic statuses (BD+ADHD and ADHD). Our objective was to evaluate whether the comorbidity poses differences in BDNF Val66Met polymorphism transmission and BDNF serum levels. Our hypothesis were that the Val66 allele would be over transmitted in subjects with JBD but not in those with ADHD, and that BDNF serum levels would be significantly different between both groups.

## Methods and Materials

### Sample

Recruitment was performed from different sources: a) from the community through press releases; b) from our ADHD outpatient program; and c) from our Child and Adolescent Bipolar Disorder Outpatient Program (ProCAB), both from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a tertiary university hospital in the capital of the Southernmost state of Brazil. The ProCAB design is registered at [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) under the identifier NCT00116259.

Inclusion criteria for BD and ADHD patients were: a) age ranging from 5 to 17 years; and b) diagnoses of BD and ADHD according to DSM-IV criteria (23). Exclusion criteria were: a) diagnoses of Pervasive Developmental Disorder, Schizophrenia and Substance Dependence; b) severe suicide/homicide risk counter indicating outpatient treatment; and c) current medication use, for BDNF serum levels. Control subjects were included if they did not present any DSM-IV current or past mental illness or history of mood disorders in first-degree relatives. Parental written informed consent and children verbal assent were obtained. This study was approved by the ethical committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (approved as an IRB by the "Office for Human Research Protections, United States of America - IRB 00000921"), and it is in accordance with the Helsinki Declaration of 1975.

#### Diagnostic assessment

Diagnostic assessment in our Child and Adolescent Bipolar Disorder Outpatient Program was conducted through a three-stage process. First, a child and adolescent psychiatrist with extensive training (GFP) interviews primary caregivers assessing the presence of DSM-IV mood symptoms, and family history of psychiatric disorders. If subjects fulfill DSM-IV criteria for Bipolar I, Bipolar II, or Bipolar NOS, they go through neuropsychological and learning disorders assessments. In addition, subjects were assessed with the K-SADS-PL (Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children-Present and Lifetime Version) by trained interviewers (24). The K-SADS-PL training process in our center consisted in several seminars about both child psychopathology in general and the structure of the instrument, live observation of 5 interviews performed by trained research assistants, and live administration of the K-

SADS-PL interview in 5 patients with the presence of trained observers. Finally, research assistants performed reliability analyses based in previous K-SADS interviews recorded in videotape. Kappa coefficient was calculated as 0.93 for mood disorders in a previous study (25). Patients and parents answer separately the mood and substance use modules, and together the other modules. Then, another child and adolescent psychiatrist performs a clinical evaluation of BD and comorbid conditions using DSM—IV criteria with parents and subjects, checking also the positive diagnoses derived from K-SADS-PL. Finally, after the entire clinical assessment, a discussion with the whole research group is conducted for final diagnoses and treatment planning. Priority is always given for the final clinical diagnoses formulated if a diagnostic disagreement occurred in this process. Of note, comorbidities like Disruptive Behavior Disorders were only considered present when they occurred before or despite the mood symptoms. The diagnostic approach in the sample from the community follows the same diagnostic flow and a very similar procedure was taken in the sample from our ADHD outpatient program (26).

### Symptom Measures

Mania symptoms were assessed with the Young Mania Rating Scale (YMRS) (27). This is an 11-item scale for the assessment of severity of mania symptoms that has similar efficiency across the age groups, including youth age 4-17. The YMRS was translated and validated into Portuguese (Kappa 0.32-0.91, intraclass correlation coefficient 0.8) (28). Presence and severity of depressive symptoms were rated using the Brazilian version of the Children Depression Rating Scale – Reviewed (CDRS-R) (29, 30) ADHD symptoms were assessed through the Swanson, Nolan and Pelham Scale – Version IV (SNAP-IV). The SNAP-IV is a likert scale measuring inattention,

hyperactivity, and oppositional symptoms. It is also validated in Portuguese, and the internal consistency of the SNAP-IV varies from good to excellent (Cronbach coefficient 0.74) (31).

Mood states were defined as follows: mania (YMRS  $\geq 7$  and CDRS-R  $< 28$ ), depression (YMRS  $< 7$  and CDRS-R  $\geq 28$ ), and euthymia (YMRS  $< 7$  and CDRS-R  $< 28$ ) (20, 30). In order to assess disorder severity, Clinical Global Impression – Severity score (CGI-S) was used. The CGI-S scale rates severity of the patient clinical presentation ranging from 1 (not at all ill) to 7 (extremely ill) (32).

The genotyping of val66met polymorphism was done with PCR method as described by Neves-Pereira et al. (33). DNA was extracted by use of the high-salt method (34).

#### BDNF serum level concentration

Four milliliters of blood were withdrawn from each subject by venipuncture into a free-anticoagulant vacuum tube. The blood was centrifuged at 4000rpm for 10 min and serum was kept frozen at 80 °C until assayed. BDNF serum levels were measured with sandwich-ELISA, using a commercial kit according to the manufacturer's instructions (Millipore, USA). Briefly, microtiter plates (96-well flat-bottom) were coated for 24 h at 4 °C with the samples diluted 1:100 in sample diluent and standard curve ranging from 7.8 to 500 pg of BDNF. Plates were then washed four times with wash buffer followed by the addition of biotinylated mouse anti-human BDNF monoclonal antibody (diluted 1:1000 in sample diluent), which was incubated for 3 h at room temperature. After washing, a second incubation with streptavidin- horseradish peroxidase conjugate solution (diluted 1:1000) for 1 h at room temperature was carried out. After addition of

substrate and stop solution, the amount of BDNF was determined (absorbance set in 450 nm). The standard curve demonstrates a direct relationship between optical density (OD) and BDNF concentration. Total protein was measured by Bradford's method (samples diluted 1:200) using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

### Statistical Analyses

The association between genetic markers and diseases was performed by a family-based association test (Transmission Disequilibrium Test) using the FBAT program (35). Other statistical Analyses were performed using the software SPSS for Windows, version 18.

Clinical and demographic characteristics were considered confounders if they were associated with both the independent factor (presence or absence of the met allele at Val66Met polymorphism or diagnostic status) and the outcome measures (BDNF serum levels) for a flexible  $p$  value of 0.1. Besides our statistical definition of confounders, we also checked the role of potential conceptual confounders (illness duration and severity, symptom severity, Intelligence Quotient). To evaluate normality distribution of the variables, the Shapiro–Wilk test was applied. Differences between groups were assessed by Student's  $t$ -test or ANOVA in case of normal distribution or otherwise by the nonparametric Kruskal-Wallis test. Correlations with serum levels were tested with Pearson's  $r$  or Spearman's  $\rho$ . The effect of diagnostic status (BD+ADHD/ADHD/Controls), genotypes, and their interaction on BDNF serum levels were examined with analysis of covariance (ANCOVA), including covariables when appropriate. A backward elimination procedure was used for nonsignificant interactions. A two-sided  $\alpha=0.05$  was accepted for analyses.

## Results

- BDNF Val66Met Polymorphism Transmission

The sample was composed by 66 children and adolescents with BD from 63 families (22 informative), and 144 ADHD subjects from 143 families (61 informative) for the BDNF Val66Met polymorphism TDT test. Genotype frequencies are presented in Table 1. Since the Met allele is considered to promote a functional change in BDNF and homozygosity for the Met allele was observed in only 3 patients with BD and 6 with ADHD, Met/Met and Val/Met carrier groups were merged and classified into Met carriers. The distributions of genotypes did not deviate from Hardy–Weinberg equilibrium in the whole sample ( $\chi^2=2.66$ ,  $p=0.26$ ), BD ( $\chi^2=3.18$ ,  $p=0.2$ ), ADHD ( $\chi^2=0.59$ ,  $p=0.75$ ), or control ( $\chi^2=2.54$ ,  $p=0.28$ ) groups. In patients with BD, we did not observe a significant transmission of the Val allele in the TDT ( $Z=0.52$   $p=0.60$ ). No significant transmission of the Val allele ( $Z=0.12$   $p=0.91$ ) was observed in ADHD as well.

INSERT TABLE 1 HERE

- BDNF Serum Levels

There were respectively 26 and 22 drug-free patients with BD and ADHD from whom gene and serum levels were available, and 32 healthy controls. Sample characteristics are presented in Table 2. Of note, as expected, age, CGI-S, YMRS, CDRS-R, SNAP-IV scores, gender, socioeconomic status, and comorbid anxiety and other disruptive disorders differed among groups, since we included a group of healthy subjects in the comparisons. However, only illness severity assessed by CGI-S scores was

considered a confounder (association with both independent and dependent factors for a  $p < 0.1$ ), and it was included in the ANCOVA model as a covariable.

INSERT TABLE 2 HERE

No BD specifier affected significantly BDNF serum levels. We did not detect any significant correlation between serum levels and IQ ( $r=0.21$ ,  $p=0.32$ ), age at onset of BD ( $r=0.31$ ,  $p=0.13$ ), disorder duration ( $r=-0.37$ ,  $p=0.07$ ), manic symptoms ( $r=0.26$ ,  $p=0.20$ ), depressive symptoms ( $r=-0.12$ ,  $p=0.5$ ), or association with psychosis ( $Z=-0.07$ ,  $p=0.94$ ), BD Subtype ( $\chi^2_{26,2}=2.56$ ,  $p=0.28$ ) or BD mood state ( $\chi^2_{26,2}=0.83$ ,  $p=0.45$ ). Thus, subjects with BD were treated as group in analyses of BDNF serum levels.

We tested the effects of two main variables (Val/Met polymorphism and diagnostic status), one co-variable (CGI-S scores) and all possible interactions on BDNF levels in the ANCOVA model with a backward procedure to eliminate non-significant interactions. Both the third-order interaction and the second-order interactions were not significant (group x gene x CGI-S:  $F_{80,15}=0.87$ ,  $p=0.43$ ; group x gene:  $F_{80,1}=0.001$ ,  $p=0.97$ ; group x CGI-S:  $F_{80,4}=0.89$ ,  $p=0.42$ ; gene x CGI-S:  $F_{80,2}=1.00$ ,  $p=0.37$ ), so that interactions were removed from the final model. We detected a significant group effect on BDNF serum levels ( $F_{80,1}=4.09$ ,  $p=0.047$ ). In the Post Hoc analyses, we observed that patients with BD+ADHD had higher serum levels than ADHD ( $p=0.03$ ), but did not present differences between BD+ADHD and controls ( $p=1.00$ ) or ADHD and controls ( $p=0.13$ ). We did not observe significant effects of the Val66Met polymorphism or CGI-S (respectively  $F_{80,1}=0.95$ ,  $p=0.33$ , and  $F_{80,4}=0.79$ ,  $p=0.53$ ).

INSERT FIGURE 1 HERE

## Discussion

This was the first investigation comparing the role of Brain-Derived Neurotrophic Factor gene and serum levels between children and adolescents with Bipolar Disorder comorbid with ADHD and those with ADHD without BD. We observed no preferential transmission of the Val allele for BD or ADHD, and no effect of the Val66Met polymorphism in BDNF serum levels. We also did not observe any difference in BDNF serum levels according to BD specifiers. A significant difference was detected in the BDNF serum levels between BD+ADHD and ADHD groups.

The absence of a preferential transmission of the Val allele at the BDNF gene replicates previous negative findings from other groups in children with BD and ADHD (36, 17). In both disorders, a first positive association result was detected, but all following replication investigations failed to find significant associations. Despite methodological differences between studies, false-positive results caused by chance in initial studies have been considered the chief cause for negative replications (37). Also, although our sample comprised BD-I, BD-II, and BD-NOS, no difference in the Val66Met transmission was observed in our sample even when we assessed only BD-I subjects ( $Z=-0.78$ ,  $p=0.47$ ).

BDNF serum levels were not associated to the Val66Met polymorphism in subjects with BD, ADHD or controls. Similar results were observed in adult studies in a comparison between BD and controls (38). We also detected absence of interaction between gene and conditions on serum levels. We did not find any study addressing this issue in children and adolescents with BD+ADHD, or ADHD. Based on previous studies in adults and animal models, we can speculate that changes in BDNF secretion are the



consequence of an interaction between the gene and the many facets of BD (it is, the Val66Met may be a functional modulator), since BDNF Met variant is believed to decrease only the activity-dependent but not the constitutive BDNF secretion (39).

Our study failed to replicate some positive results in investigations with adults with BD on differences in BDNF serum levels according to mood state, disorder duration and age at onset, symptom severity, comorbidity with ADHD or psychosis (13, 18-20). Although our sample may have been too small to detect such differences, it is possible that associations between those BD specifiers in BDNF serum levels are not present in early age. Disparities between pediatric and adult BD are also seen in symptom presentation, comorbidity profile, and neuroimaging studies, among others (2, 40, 41). For example, smaller hippocampal volumes have been reported in children and adolescents with BD when compared to controls (40), but comparisons between adult subjects with BD and controls revealed larger hippocampus volumes in BD (41). These discrepancies could be the result of ongoing brain normal development, or to a progressive failure in the adult brain to maintain normal BDNF levels because of the damage caused by multiple manic and depressive crises, and by chronic stress caused by environmental factors (42).

We detected lower levels of serum BDNF in subjects with ADHD when compared to BD+ADHD, and, more surprisingly, BDNF serum levels similar to controls in patients with BD+ADHD. This finding suggests the dysregulation in neurotrophic factors may not be present in early age or early stages of both disorders, but different patterns of neuroplasticity between BD+ADHD and ADHD are observed. We may suspect that higher BDNF levels in the patients with the comorbidity reflect a larger reaction to

additional brain insult and distress caused by the comorbidity, and that compensatory mechanisms such as antioxidant enzymes and brain metabolism markers may maintain normal BDNF levels, as observed in patients with schizophrenia (43). However, our results contrast with previous studies (18, 19, 21, 22). The disparities may be the result of methodological differences between studies, but a comparison is difficult since description of BD subtype, IQ, and comorbidities is not available (21, 22). However, we conducted a very thorough statistical control for those variables through confounder inclusion in the models, which was not conducted in the previous investigations. Another important limitation in the comparison of the results is the BDNF source. BDNF levels may behave differently according to its source – whole blood, serum, plasma or platelets. Serum levels include free BDNF and platelet-stored BDNF (this latter is not released into plasma), so that serum levels may be more a more direct and representative measure of the peripheral (and, consequently, central) BDNF activity (44). Also, since peripheral BDNF levels are not specific to any regions of the brain, the differences detected may also reflect different brain areas and networks affected by these conditions when BD and ADHD are comorbid (7,10,11).

Some limitations of our study should be acknowledged. Our sample did not include patients with BD alone, and we also had a low rate of euthymic subjects. In an ideal research world, a large group of unmedicated patients with BD without ADHD should be included. However, the greatest challenge in investigations of the neurobiology of child mental disorders is to find specific neurobiological underpinnings for disorders that are difficult to differentiate phenotypically. High rates of comorbid ADHD are commonplace in all clinical samples of JBD (5). Finally, our sample sizes in both

diagnostic groups might have been too small for detecting an effect of the Val/Met polymorphism, but our sample size of JBD was one of the largest assessed and comparable to the only study in which an association was detected (16).

We would like to emphasize that the difference detected in BDNF serum levels in our study is one of the few clues currently available to draw a better understanding of neurobiological differences between BD+ADHD and ADHD. Although by this time we cannot make clinical inferences from our findings, further exploration of the role of BDNF serum levels in the pathophysiology of JBD is needed.

### Acknowledgments

This work was supported by a research grant from the Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE) from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG 07-642).

## Financial Disclosures

Drs Zeni and Pheula have received travel grants from Abbott to attend a national research meeting, and Dr Zeni and Maia received a travel grant from Novartis to attend an international psychiatry meeting. Dr. Tramontina has been a member of the speakers' board for Abbott, and Dr Maia for Novartis. Dr. Maia has received research grants from CNPq; CAPES; Ministério da Saúde; Ministério da Ciência e Tecnologia; CT-Saúde; DECIT. Drs. Salatino-Oliveira, Ludwig, and Hutz report no financial or other relationship relevant to the subject of this article. Bianca Wollenhaupt de Aguiar is supported by a scholarship from Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas (CAPES), Brazil. She has disclosed no other relevant financial relationships. Dr. Szobot is on the speakers' bureau of Janssen-Cilag and Novartis pharmaceutical companies and had travel support by Novartis in 2009. Dr. Kapczinski is a NARSAD Independent Investigator and is supported by the Stanley Medical Research Institute, CNPq, INCT-TM, CAPES, FIPE-HCPA. Additionally, he is a speaker and/or advisor and/or receives research support from Lilly, AstraZeneca, Janssen, Servier, and Roche. Dr Rohde was on the speakers' bureau and/or acted as consultant for Eli-Lilly, Janssen-Cilag, Novartis, and Shire in the last three years (less than U\$ 10,000 per year and reflecting less than 5% of his gross income per year). The ADHD and Juvenile Bipolar Disorder Outpatient Programs chaired by him received unrestricted educational and research support from the following pharmaceutical companies in the last three years: Abbott, Bristol-Myers Squibb, Eli-Lilly, Janssen-Cilag, Novartis, and Shire.

## References

1. Youngstrom EA, Freeman AJ, Jenkins MM. (2009): The assessment of children and adolescents with bipolar disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 18: 353-390, viii-ix.
2. Moreno C, Laje G, Blanco C, Jiang H, Schmidt AB, Olfson M. (2007): National trends in the outpatient diagnosis and treatment of bipolar disorder in youth. *Arch Gen Psychiatry* 64: 1032-1039.
3. Zeni CP, Tramontina S, Ketzer CR, Pheula GF, Rohde LA. (2009): Methylphenidate combined with aripiprazole in children and adolescents with bipolar disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder: a randomized crossover trial. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 19: 553-561.
4. Consoli A, Bouzamondo A, Guilé JM, Lechat P, Cohen D. (2007): Comorbidity with ADHD decreases response to pharmacotherapy in children and adolescents with acute mania: evidence from a metaanalysis. *Can J Psychiatry* 52: 323-328.
5. Galanter CA, Leibenluft E. (2008): Frontiers between Attention Deficit Hyperactivity Disorder and Bipolar Disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 17: 325-346.
6. Milberger S, Biederman J, Faraone SV, Murphy J, Tsuang MT. (1995): Attention deficit hyperactivity disorder and comorbid disorders: issues of overlapping symptoms. *Am J Psychiatry* 152: 1793-1799.

7. Passarotti AM, Sweeney JA, Pavuluri MN. (2010): Differential engagement of cognitive and affective neural systems in pediatric bipolar disorder and attention deficit hyperactivity disorder. *J Int Neuropsychol Soc* 16: 106-117.
8. Henin A, Mick E, Biederman J, Fried R, Wozniak J, Faraone SV, et al. (2007): Can bipolar disorder-specific neuropsychological impairments in children be identified? *J Consult Clin Psychol* 75: 210-220.
9. Dickstein DP, Garvey M, Pradella AG, Greenstein DK, Sharp WS, Castellanos FX, et al. (2005): Neurologic examination abnormalities in children with bipolar disorder or attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 58: 517-524.
10. Lopez-Larson M, Michael ES, Terry JE, Breeze JL, Hodge SM, Tang L, et al. (2009): Subcortical differences among youths with attention-deficit/hyperactivity disorder compared to those with bipolar disorder with and without attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 19: 31-39.
11. Moore CM, Biederman J, Wozniak J, Mick E, Aleardi M, Wardrop M, 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.
12. Dias VV, Brissos S, Frey BN, Andreazza AC, Cardoso C, Kapczinski F. (2009): Cognitive function and serum levels of brain-derived neurotrophic factor in patients with bipolar disorder. *Bipolar Disord* 11: 663-671.
13. Kapczinski F, Frey BN, Kauer-Sant'Anna M, Grassi-Oliveira R. (2008): Brain-derived neurotrophic factor and neuroplasticity in bipolar disorder. *Expert Rev Neurother* 8: 1101-1113.

14. Berk M. (2009): Neuroprogression: pathways to progressive brain changes in bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 12:441- 445.
15. Fan J, Sklar P. (2008): Genetics of bipolar disorder: focus on BDNF Val66Met polymorphism. *Novartis Found Symp* 289: 60-72.
16. Geller B, Badner JA, Tillman R, Christian SL, Bolhofner K, Cook EH. (2004): Linkage disequilibrium of the brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism in children with a prepubertal and early adolescent bipolar disorder phenotype. *Am J Psychiatry* 161: 1698-1700.
17. Gizer IR, Ficks C, Waldman ID (2009): Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet* 126:51-90.
18. Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Teixeira AL, Magalhaes PV, Kauer-Sant'Anna M, Klamt F, et al. (2011): Peripheral biomarkers and illness activity in bipolar disorder. *J Psychiatr Res* 45: 156-161.
19. Fernandes BS, Gama CS, Maria Ceresér K, Yatham LN, Fries GR, Colpo G, et al. (2011): Brain-derived neurotrophic factor as a state-marker of mood episodes in bipolar disorders: A systematic review and meta-regression analysis. *J Psychiatr Res* 45: 995-1004.
20. Cunha AB, Frey BN, Andreazza AC, Goi JD, Rosa AR, Goncalves CA, et al. (2006): Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. *Neurosci Lett* 398: 215-219.
21. Pandey GN, Rizavi HS, Dwivedi Y, Pavuluri MN. (2008): Brain-derived neurotrophic factor gene expression in pediatric bipolar disorder: effects of treatment and clinical response. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 47: 1077-1085.



22. Shim SH, Hwangbo Y, Kwon YJ, Jeong HY, Lee BH, Lee HJ, Kim YK. (2008): Increased levels of plasma brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in children with attention deficit-hyperactivity disorder (ADHD). *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32: 1824-1828.
23. American Psychiatric Association (1994): *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th ed. Washington, DC: American Psychiatric Press.
24. Kaufman J, Birmaher B, Brent D, Rao U, Flynn C, Moreci P, et al. (1997): Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children—Present and Lifetime Version (K-SADS-PL): initial reliability and validity data. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 36: 980-988.
25. Polanczyk GV, Eizirik M, Aranovich V, Denardin D, da Silva TL, da Conceição TV, et al. (2003): Interrater agreement for the schedule for affective disorders and schizophrenia epidemiological version for school-age children (K-SADS-E). *Rev Bras Psiquiatr* 25: 87-90.
26. Rohde LA, Szobot C, Polanczyk G, Schmitz M, Martins S, Tramontina S. (2005): Attention-deficit/hyperactivity disorder in a diverse culture: do research and clinical findings support the notion of a cultural construct for the disorder? *Biol Psychiatry* 57:1436-1441.
27. Young RC, Biggs JT, Ziegler VE, Meyer DA. (1978): A rating scale for mania: reliability, validity and sensitivity. *Br J Psychiatry* 133: 429-435.
28. Vilella JA, Crippa JA, Del-Ben CM, Loureiro SR. (2005): Reliability and validity of a Portuguese version of the Young Mania Rating Scale. *Braz J Med Biol Res* 38: 1429-1439.

29. Poznanski EO, Grossman JA, Buchsbaum Y, Banegas M, Freeman L, Gibbons R. (1984): Preliminary studies of the reliability and validity of the children's depression rating scale. *J Am Acad Child Psychiatry* 23: 191-197.
30. Barbosa GA, Dias MD, Gaião AA, Di Lorenzo WF. (1997): Escala para avaliação de depressão em crianças - revisada (CDRS-R): uma análise exploratória. *Rev Neuropsiquiatr Infanc Adolesc* 5: 15-18.
31. Mattos P, Serra-Pinheiro M, Rohde L, Pinto D. (2006): Apresentação de uma versão em português para uso no Brasil do instrumento MTA-SNAP-IV de avaliação de sintomas de transtorno do déficit de atenção/hiperatividade e sintomas de transtorno desafiador e de oposição. *Rev Psiquiatr RS* 28: 290-297.
32. Guy W (2000): Clinical Global Impressions (CGI) Scale. In: Mental Health Status, Functioning, and Disabilities Measures. *APA Task Force for the Handbook of Psychiatric Measures*.
33. Neves-Pereira M, Mundo E, Muglia P, King N, Macciardi F, Kennedy JL. (2002): The brain-derived neurotrophic factor gene confers susceptibility to bipolar disorder: evidence from a family-based association study. *Am J Hum Genet* 71: 651-655.
34. Lahiri DK, Nurnberger JI Jr. (1991): A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19: 5444.
35. Laird, N., Horvath, S. and Xu, X. (2000): Implementing a unified approach to family based tests of association. *Genet Epidemiol* 19: S36-S42.
36. Mick E, Wozniak J, Wilens TE, Biederman J, Faraone SV. (2009): Family-based association study of the BDNF, COMT and serotonin transporter genes and DSM-IV bipolar-I disorder in children. *BMC Psychiatry* 4; 2.

37. Colhoun HM, McKeigue PM, Davey Smith G. (2003): Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet* 361: 865-872.
38. Tramontina J, Frey BN, Andreazza AC, Zandona M, Santin A, Kapczinski F. (2007): Val66met polymorphism and serum brain-derived neurotrophic factor levels in bipolar disorder. *Mol Psychiatry* 12:230-231.
39. Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, et al. (2003): The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112: 257–269.
40. Frazier JA, Chiu S, Breeze JL, Makris N, Lange N, Kennedy DN, et al. (2005): Structural brain magnetic resonance imaging of limbic and thalamic volumes in pediatric bipolar disorder. *Am J Psychiatry* 162: 1256-1265.
41. Javadapour A, Malhi GS, Ivanovski B, Chen X, Wen W, Sachdev P. (2010): Hippocampal volumes in adults with bipolar disorder. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 22: 55-62.
42. Kauer-Sant'Anna M, Kapczinski F, Andreazza AC, Bond DJ, Lam RW, Young LT, Yatham LN. (2009): Brain-derived neurotrophic factor and inflammatory markers in patients with early- vs. late-stage bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 12:447-458.
43. Gama CS, Berk M, Andreazza AC, Kapczinski F, Belmonte-de-Abreu P. (2008): Serum levels of brain-derived neurotrophic factor and thiobarbituric acid reactive substances in chronically medicated schizophrenic patients: a positive correlation. *Rev Bras Psiquiatr* 30:337-40.

44. Karege F, Bondolfi G, Gervasoni N, Schwald M, Aubry JM, Bertschy G. (2005): Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. *Biol Psychiatry* 57:1068-1072.

## Table/Figure Legends, and Appendices

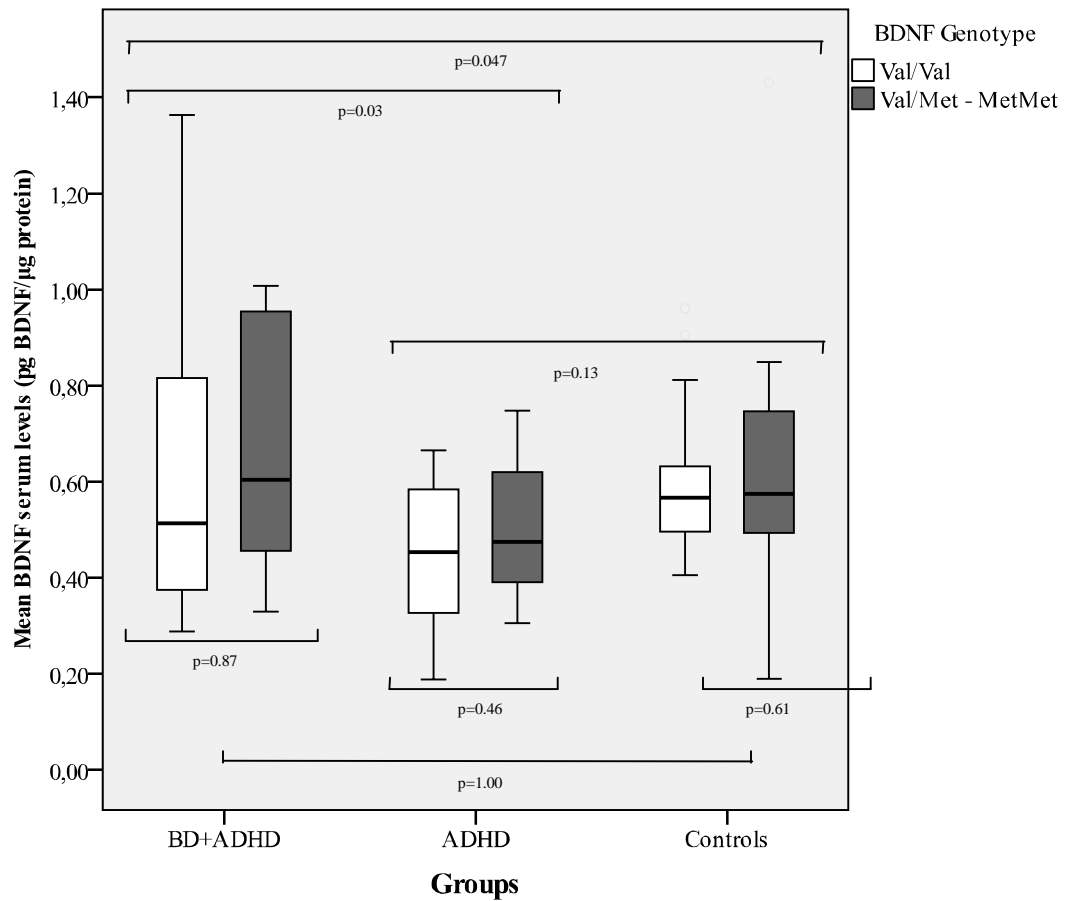
Table 1. Allelic and Genotypic Frequencies in Children and Adolescents with Bipolar Disorder, Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder, and Healthy Subjects

Group	Genotype		
	Val/Val	Val/Met	Met/Met
Bipolar Disorder n= 66	49 (74.2%)	14 (21.2%)	3 (4.6%)
Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder n= 144	97 (67.4%)	41 (28.4%)	6 (4.2%)
Controls n=32	25 (78.1%)	6 (18.8%)	1 (3.1%)
Total n=242	171 (70.7%)	61 (25.2%)	10 (4.1%)

Table 2. Sociodemographic and Clinical Characteristics of the Sample

	Bipolar Disorder with ADHD (n= 26)	Controls (n=32)	Attention-Deficit/ Hyperactivity Disorder (n=22)	p
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	
Age (years)	12.38±3.18	12.19±3.38	10.41±3.49	0.08
IQ	89.58±13.43	84.43±14.17	95.24±17.29	0.13
BD age at onset (years)	8.4±3.92	-	-	-
ADHD age at onset (years)	5.65±2.44	-	5.89±1.56	0.70
Duration of Disorder (years)	4.2±2.77	-	4.57±3.71	0.93
Clinical Global Impression – Severity Score	48.32±8.31	1±0	54.23±8.61	<0.01
Young Mania Rating Scale Score	21.12±13.94	0.63±0.35	2.81±2.56	<0.01
Children's Depression Rating Scale, Revised Score	40.81±15.49	17.72±1.08	21.43±4.20	<0.01
SNAP-IV Total Score	1.77±0.67	0.16±0.15	1.46±0.53	<0.01
	Frequencies n (%)		Frequencies n (%)	
Gender (Male)	16 (61.5%)	15 (46.8%)	17 (77.3%)	0.08
Socioeconomic Status	B: 13 (50%) C: 13 (50%) D: 0	B: 5 (15.6%) C: 24 (75%) D: 3 (9.4%)	B: 7 (31.82%) C: 12 (54.55%) D: 3 (13.63%)	0.06
Ethnicity (Caucasian)	21 (80.8%)	27 (84.4%)	15 (68.2%)	0.24
Family History of BD	16 (61.5%)	-	4 (18.8%)	0.01
Current Comorbidities				
Anxiety Disorders	9 (36%)	-	5 (22.7%)	<0.01
Other Disruptive Behavior Disorders	14 (70%)	-	10 (47.6%)	<0.01
BD Specifiers				
BD Subtype	Type I-15 (57.7%) Type II-5 (19.2%) Type NOS-6 (23.1%)	-	-	
Baseline Mood State	Euthymia: 2 (7.7%) Mania: 20 (76.9%) Depression: 4 (15.4%)	-	-	-

Figure 1. Mean BDNF Serum Levels According to Disorder and BDNF Val66Met Polymorphism\*



\* BD – Bipolar Disorder; ADHD – Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. Error bars: 95% Confidence Interval. Differences between the BD+ADHD and controls are not included ( $p=1.00$ ).

**ARTIGOS**

Artigo 2

Título em Português: Metilfenidato Combinado ao Aripiprazol em Crianças e Adolescentes com Transtorno Bipolar e Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade: Um Ensaio Clínico Cruzado

Título em Inglês: Methylphenidate combined to Aripiprazole in Children and Adolescents with Bipolar Disorder and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Randomized Crossover Trial

Artigo publicado no Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology



Word count: 3187 (text only). 37 references.

**Methylphenidate combined to Aripiprazole in Children and Adolescents with  
Bipolar Disorder and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Randomized  
Crossover Trial**

Cristian Patrick Zeni, MD; Silzá Tramontina, MD; Carla Ruffoni Ketzer, MD; Gabriel  
Ferreira Pheula, MD; Luis Augusto Rohde, PhD.

From the Juvenile Bipolar Disorder Outpatient Program (ProCAB), Division of Child and  
Adolescent Psychiatry, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio  
Grande do Sul, Brasil

Potential conflicts of interests: Drs Zeni and Pheula have received travel grants from  
Abbott to attend a national research meeting. Dr Tramontina has been a member of the  
speakers board for Abbott. Dr Ketzer reports no financial or other relationship relevant to  
the subject of this article. Dr Rohde was on the speakers' bureau and/or acted as  
consultant for Eli-Lilly, Janssen-Cilag, and Novartis in the last three years. Currently, his  
only industry related activity is taking part of the advisory board/speakers bureau for Eli  
Lilly and Novartis (less than U\$ 10,000 per year and reflecting less than 5% of his gross  
income per year). The ADHD and Juvenile Bipolar Disorder Outpatient Programs chaired  
by him received unrestricted educational and research support from the following

pharmaceutical companies in the last three years: Abbott, Bristol-Myers Squibb, Eli-Lilly, Janssen-Cilag, Novartis, and Shire.

This work was fully supported by research grants from: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) (Grant 471761/03-6), and Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG 03-325). Aripiprazole was provided by Bristol-Myers Squibb without restrictions. This is an independent investigator trial. This manuscript has not been published and is not under consideration for publication elsewhere.

Acknowledgments: The authors would like to thank Roberta Coelho, BA, Aline Sokolovsky, BA, and Joana Narvaez, BA, for neuropsychological assessment, and Clarissa Paim, BA, for administrative assistance. All acknowledged personnel are from the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Ms. Coelho, Sokolovsky, Narvaez, and Paim do not have any potential conflicts of interest to disclosure.

Corresponding author: Dr. Luis Augusto Rohde, Serviço de Psiquiatria da Infância e Adolescência, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Zip code: 90035-903. E-mail: [lrohde@terra.com.br](mailto:lrohde@terra.com.br)

Last revision: 03-28-09

Running Title: Methylphenidate combined to Aripiprazole in JBD + ADHD

## Abstract

In clinical samples, Juvenile Bipolar Disorder (JBD) is frequently accompanied by comorbid Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD). Clinical trials assessing combined psychopharmacological interventions in this population are scarce, and methylphenidate may worsen manic symptoms. We conducted a randomized crossover trial with methylphenidate and placebo (2 weeks each) combined to aripiprazole in children and adolescents ( $n=16$ ; 8-17 years-old) with JBD and ADHD who had a significant response in manic symptoms with aripiprazole but still presented clinically significant symptoms of ADHD. ADHD, manic and depressive symptoms were assessed by means of standard scales. Fourteen out of the 16 subjects completed the trial. No significant differences between the effects of methylphenidate and placebo were detected in ADHD ( $F_{1, 43.22}=0.00$ ;  $p=0.97$ ) or manic ( $F_{1, 40.19}=0.93$ ;  $p=0.34$ ) symptoms. Significant improvement in depressive symptoms was observed in the methylphenidate group ( $F_{1,19.03}=7.75$ ;  $p=0.01$ ). One patient discontinued the trial due to the onset of a severe mixed episode. No other significant adverse events were observed. Although methylphenidate did not worsen manic symptoms, it was not more effective than placebo in improving ADHD symptoms in children and adolescents with JBD comorbid with ADHD stabilized with aripiprazole. Further investigations are warranted.

Registered at [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) under the identifier NCT00305370.

Key-words: Bipolar Disorder, ADHD, children, adolescents, aripiprazole, methylphenidate, crossover trial.

## INTRODUCTION

Juvenile Bipolar Disorder (JBD) is a severe mental disorder characterized by mood swings causing significant distress in social, academic, and peer functioning.(Axelson et al. 2006, Wilens et al. 2004) The available data suggest it affects 1% of the children and adolescents.(McLellan et al. 2007) Comorbidity with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) is frequent in JBD, ranging from 29-98% in clinical samples.(Kowatch et al. 2005a, Wozniak et al. 1995, Tramontina et al. 2003) The presence of ADHD in subjects with JBD may confer worse functional outcome and response to treatment.(Consoli et al. 2007, Strober et al. 1998)

In spite of the several studies trying to differentiate clinical manifestations peculiar to JBD and ADHD, studies assessing interventions for the dual diagnoses are scarce. (Galanter & Leibenluft 2008) Mood stabilizers and/or atypical antipsychotics are the main agents to treat BD in children and adolescents, (McLellan et al. 2007) and stimulants, like methylphenidate, are first line treatment for ADHD. (AACAP 2007)

Some old reports suggest that the use of stimulants in children and adolescents might be a risk factor for the development of mania (see Koehler-Troy et al. 1986) and psychosis. (Cherland and Fitzpatrick 1999) However, more recent literature addressing treatment of ADHD in patients with JBD have suggested a positive response to stimulants, not supporting the idea that stimulant use predicts mania or psychosis. (Carlson et al. 1992, Kowatch et al. 2003, Biederman et al. 1999, Pavuluri et al. 2004, Kowatch et al. 2005b)

Two previous randomized clinical crossover trials have been published to our knowledge on this issue. (Scheffer et al. 2005, Findling et al. 2007) Scheffer et al.

conducted a 2-stage trial, where the first phase was an 8-week open trial of divalproex sodium. (Scheffer et al. 2005) Patients with JBD+ADHD (n=40) who presented improvement of manic symptoms according to the Young Mania Rating Scale (YMRS), but no significant improvement of ADHD symptoms according to Clinical Global Impression – Improvement scale (CGI-I) were invited to join a 4-week randomized, double-blind, placebo controlled crossover trial of Mixed Amphetamine Salts (MAS) (n=30, age range 8-17 years-old). Significant improvement in ADHD symptoms was observed in the MAS group, while no significant between-group change in the YMRS was detected. MAS were considered safe and effective without promoting destabilization of BD. However, this study presented some limitations, such as the absence of a specific measure of ADHD.

Findling et al. conducted a 4-week double-blind, placebo controlled crossover trial of methylphenidate in 16 children and adolescents with the comorbidity. (Findling et al. 2007) Best dose week of treatment (5mg-10mg-15mg) was compared to placebo, and a significant difference was observed between medicated and non medicated groups in the ADHD rating scale-IV (ARS-IV) and Connors Parent Rating Scale. No significant difference was observed in the changes in scores of the YMRS and the Children Depression Rating Scale-Revised (CDRS-R). These findings should be understood in the context of some limitations. For example, the use of concomitant medication and the inclusion of BD-not otherwise specified (BD-NOS), allowing significant heterogeneity in such a small sample.

Due to both the high comorbidity rates of ADHD among JBD patients and the scarcity of studies investigating the treatment of both conditions, our objective was to

assess response to methylphenidate in children and adolescents with JBD+ADHD previously stabilized with aripiprazole. Our hypothesis was that patients would present a significantly higher response to MPH than to placebo in ADHD symptoms while no significant mood changes will be detected during the trial.

## METHODS

### Subjects

Subjects were recruited from two previous investigations: a) a double-blind placebo-controlled clinical trial of aripiprazole (Registered at [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) under the identifier NCT00116259) (Tramontina et al., in press); b) an open trial following that study allowing patients who used placebo to switch to aripiprazole (See figure 1). (Tramontina et al. 2007) Shortly, 710 subjects were recruited from community through press releases and were extensively assessed for JBD and ADHD. Out of 43 subjects with confirmed dual diagnoses, 18 were randomized to receive aripiprazole, and 10 presented improvement in the manic symptoms but not in the ADHD symptoms. In the placebo arm, 12 out of 25 enrolled subjects participated in the open trial of aripiprazole after finishing the 6 weeks with placebo, and 6 out of these 12 were eligible for the crossover trial.

### INSERT FIGURE 1 HERE

Inclusion criteria for the trials were: a) age ranging from 8 to 17 years; b) diagnoses of BD Type I or II comorbid with ADHD according to DSM-IV criteria; (APA 1994) c) clear reports of ADHD symptoms onset preceding any mood symptomatology; d) at least 30% improvement in mood symptoms in the previous trials of aripiprazole; e) residual attention, hyperactivity, and opposition symptoms defined as a SNAP-IV score  $\geq$

1.5. Exclusion criteria were: a) estimated IQ lower than 70 - assessed using the Wechsler Intelligence Scale for Children, 3rd edition – WISC-III – by a trained psychologist; (Wechsler 1991) b) use of any medication 10 weeks before entering the study, besides aripiprazole; c) diagnoses of Pervasive Developmental Disorder, Schizophrenia, Substance Abuse or Dependence; d) severe suicide/homicide risk counter indicating outpatient treatment; e) history of hypersensitivity to aripiprazole or methylphenidate; f) any other acute or chronic disease that may interfere in the study; g) pregnancy.

Parental written informed consent and children verbal assent were obtained. This study was approved by the ethical committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and it is registered at [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) under the identifier NCT00305370.

#### Diagnostic Assessment

The initial assessment comprised a telephone interview conducted by a child psychiatrist for identification of eligible candidates. When primary caregivers endorsed symptoms of BD and ADHD according to DSM-IV criteria in their children and exclusion criteria were ruled out, children and adolescents underwent a confirmatory three-stage process, described in Tramontina et al., 2007. Shortly, the evaluation was composed by: a) a semi-structured interview (Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children, Epidemiological Version – K-SADS-E)(Orvaschel 1985), modified to assess DSM-IV criteria and applied to parents by trained research assistants; b) review of each diagnosis derived through the K-SADS-E in a clinical committee; c) clinical evaluation by an experienced child psychiatrist who previously received the results of the K-SADS-E. Priority was always given for the final clinical diagnoses if a diagnostic disagreement occurred in this three stage process.

### Treatment Protocol

An independent third party randomized patients into groups A and B and prepared weekly pill pack supplies of aripiprazole (with the same dose from the previous double-blind or open trial - ranging from 5-20mg; mean 12.81; standard deviation 6.32) and methylphenidate or placebo. Aripiprazole was administered once a day. Methylphenidate immediate release (IR) was supplied in fixed doses, according to weight. Methylphenidate IR and Placebo were administered twice a day. Patients from Group A followed the sequence (PLA – PLA – MPH 0.3mg/kg/day – MPH 0.7mg/kg/day), and group B received MPH 0.3mg/kg/day – MPH 0.7mg/kg/day – PLA – PLA). A pharmacist packaged methylphenidate and matching placebo in capsules, so that they could not be differentiated by shape, color, smell, weight or taste.

Patients were assessed weekly for 4 weeks after the baseline evaluation. No concomitant medication was allowed during the study period. Compliance was checked by self-report, mother's report and pill counting in the blister packs returned at the end of each week. After all the four assessments were completed, the study blind was broken.

### Efficacy Measures

Primary outcome measures: between-group differences in weekly scores in the Brazilian versions of the Swanson, Nolan, and Pelham Scale – IV Version (SNAP-IV), and of the Young Mania Rating Scale (YMRS). (MTA 1999, Mattos et al. 2006, Youngstrom et al. 2002, Vilela et al. 2005) The SNAP-IV is a likert scale ranging from 0 to 3, and it has been frequently used to assess clinical interventions in ADHD. (MTA 1999, Mattos et al. 2006) The YMRS is an 11-item scale to assess changes in manic symptoms along time. It has been the most used instrument in clinical trials with children



and adolescents with JBD. (Youngstrom et al. 2002) Changes in depressive symptoms were evaluated with the Brazilian version of the Children Depression Rating Scale – Reviewed (CDRS-R).(Poznanski et al. 1979, Barbosa et al. 1997) This instrument is a 17-item clinician administered scale that assesses presence and severity of depressive symptoms.

Secondary outcome measures: between-group differences in weekly scores of: a) the Child Mania Rating Scale-Parent Version (CMRS-P), a parental report on severity of manic symptoms. (Pavuluri et al. 2006) Since there was not any Portuguese validated version of the CMRS-P when the study was conceptualized, we conducted a process of translation and back-translation of the instrument by independent teams, and the final version was approved by the authors of the scale (consistency and test-retest reliability of the original version are both 0.96); b) Clinical Global Impression-Severity (CGI-S), an instrument widely used in psychopharmacological interventions (its scores range from 1 - not at all ill - to 7 - extremely ill), was applied to rate severity of patients' clinical presentation (Guy 2000); c) the Kutcher Adolescent Depression Scale (KADS).(Brooks et al. 2003) This scale is an 11-item self report instrument to detect and monitor depression in adolescents. Its mean correlation with clinician administered depression rating scales is 0.69. Since no previous Portuguese validated version of the KADS was available, we again conducted a process of translation and back-translation of the instrument by independent teams and the final version was approved by the authors of the scale.

Adverse events

Stimulants adverse events were also checked weekly through Barkley Stimulants Adverse Events Rating Scale (SAERS), an instrument frequently used in trials of methylphenidate. (Barkley et al. 1990; Zeni et al. 2007) Adverse events were also assessed using an open question (“Have you felt anything different since last week?”). According to recommendations from experts, (Greenhill et al. 2004) we complemented the assessment of adverse events with a checklist of all forty-nine adverse events associated with the use of aripiprazole described in the literature. Weight was assessed weekly.

#### Statistical analyses

Analyses of primary and secondary outcome measures were performed using a Mixed-Effects Model (MEM) approach which provides a flexible framework for the analysis of repeated measures while accounting for missing data (i.e., lost to follow-up). For each analysis, the best covariance structure fitting the data was selected using Akaike's Information Criterion (AIC).

Treatment, period, sequence and dose-within-treatment were fixed variables. Covariates were baseline scores for each instrument. A significance level of 5% was set for all analyses. Analyses were carried on using the software SPSS for Windows, version 15. No carry-over effect was expected, since MPH is suitable for crossover designs due to its clinical response limited to no more than 4-5 hours, avoiding carry-over effects. (Szobot et al. 2008)

## RESULTS

Fourteen out of the 16 patients enrolled completed the trial. Baseline characteristics of the sample are presented in Table 1. Of note, patients presented low

rates of manic symptoms (YMRS scores of  $11.14 \pm 9.32$  in the whole sample;  $14.66 \pm 10.34$  in the group receiving placebo followed by methylphenidate;  $8.5 \pm 8.14$  in the other group) due to the previous use of aripiprazole, and moderate ADHD symptoms (SNAP-IV baseline scores of  $1.64 \pm 0.54$  for the whole sample;  $1.83 \pm 0.61$  in the group receiving placebo followed by methylphenidate; SNAP-IV baseline scores of  $1.50 \pm 0.45$  in the other group).

#### INSERT TABLE 1 HERE

One patient using aripiprazole and methylphenidate left the protocol in the second week due to the need of hospitalization, and was excluded from the analyses. Another patient using aripiprazole and placebo did not present for the final assessment and was also excluded from the analyses. Complementary analyses were conducted including the subject who did not show up for the final visit (data available under request), but no significant change was detected from the results described below.

Twenty-four pills of aripiprazole out of 420 were returned in the blisters (5.71%). Twelve out of 422 (2.76%) pills were returned in the placebo group, and 18 out of 406 pills (4.43%) were returned in the methylphenidate group during the study. No significant difference was detected ( $p=0.27$ ). Results for all outcomes are reported in Table 2.

#### Primary Outcomes:

ADHD: The MEM analyses revealed no significant treatment ( $p=0.97$ ), period ( $p=0.42$ ), or sequence ( $p=0.93$ ) effects over ADHD symptoms according to SNAP-IV score changes. Baseline SNAP-IV scores were significantly associated with response to treatment ( $p \leq 0.05$  for all SNAP-IV subscales).

Mania: No significant treatment ( $p=0.34$ ), period ( $p=0.16$ ), or sequence ( $p=0.81$ ) effects were observed in YMRS score changes. The baseline YMRS score was significantly associated with response to treatment ( $F1, 12.03 = 16.44; p \leq 0.01$ ).

Depression: CDRS-R score changes were not significantly associated to treatment ( $p=0.54$ ), period ( $p=0.81$ ) or sequence ( $p=0.98$ ) effect in MEM analyses. We also did not find the effect of the CDRS-R baseline score ( $p = 0.63$ )

INSERT TABLE 2 HERE

Secondary outcomes:

Mania: According to parental report in the CMRS-P, MEM analyses revealed no significant treatment ( $p=0.09$ ), period ( $p=0.19$ ), or sequence ( $p=0.43$ ) effect over manic symptoms. Significant dose-within-treatment effect ( $F1, 34.7 = 4.05; p = 0.05$ ) was detected. Baseline CMRS-P scores were also associated to response in manic symptoms ( $F1, 14.23 = 189.22; p < 0.001$ ).

Depression: According to the youth's self report, a significant treatment effect was observed ( $F1, 19.03 = 7.75; p = 0.01$ ). No significant period ( $p=0.92$ ), sequence ( $p=0.3$ ) or dose-within-treatment differences ( $p=0.87$ ) were detected. Also, baseline KADS score was associated with changes in KADS scores ( $F1, 14.98 = 5.14 p = 0.04$ )

Global Impression: no significant treatment ( $p=0.6$ ), period ( $p=0.68$ ), or sequence ( $p=0.97$ ) effect on global functioning was observed according to the CGI-S score. The baseline CGI-S score had a significant effect in the outcome ( $F1, 15.06 = 15.20; p=0.001$ ).

Adverse Events: The MEM analyses revealed no significant treatment ( $p=0.26$ ), period ( $p=0.42$ ), or sequence ( $p=0.77$ ) effect on the onset of adverse events related to

stimulants as measured by the SAERS. Baseline SAERS score had a significant effect on final scores ( $F_{1, 15.10} = 45.02$ ,  $p < 0.01$ ). See Table 3 for detailed frequency of adverse events related to stimulants along the trial. Also, no significant treatment ( $p = 0.12$ ), period ( $p = 0.35$ ), or sequence ( $p = 0.89$ ) effect was detected on the onset of adverse events related to the addition of stimulants in the frequency of adverse events related to the use of aripiprazole. Baseline adverse events count had a significant effect on final results ( $F_{1, 13.40} = 13.6$ ;  $p < 0.01$ ).

Moreover, no significant treatment ( $p = 0.35$ ), period ( $p = 0.29$ ), or sequence ( $p = 0.08$ ) effect of methylphenidate over weight was observed, when compared to placebo.

INSERT TABLE 3 HERE

## DISCUSSION

In a 4-week crossover trial of methylphenidate vs. placebo in children and adolescents presenting Bipolar Disorder comorbid with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder previously stabilized with aripiprazole, we found no significant between-group differences in changes in attention, hyperactivity, mania symptoms, and weight. A significant response in depressive symptoms was observed, according to a secondary self-report measure.

Our findings regarding ADHD differ from those found in previous studies. The trial with MAS in patients previously treated with divalproex (Scheffer et al. 2005) reported stimulants to be more effective than placebo. However, no specific ADHD instrument was used in that trial to measure improvement in these symptoms, so that the observed “attentional” effect may be related to changes in mania. The only RCT

conducted with methylphenidate showed a significant effect of methylphenidate over placebo in ADHD symptoms in patients previously treated with lithium and/or divalproex using a “best dose week” statistical approach (Findling et al. 2007). However, that study also included BD-NOS subjects, and permitted use of concomitant medication. The current study may have a methodologically more sound design to assess outcomes in such a heterogeneous condition as JBD, since we only allowed the inclusion of BD I or II. The open trial conducted by Carlson et al. (1992) also reported improvement of inattention symptoms with the use of the combination of lithium and low doses of methylphenidate (5 or 10mg).

Our results concur with findings from previous studies regarding exacerbation of mania or onset of psychosis with the use of stimulants. The other RCT using the same psychopharmacological agent (methylphenidate) provided in this trial also found no significant changes in mood symptoms (Findling et al. 2007) according to the same instruments (YMRS and CDRS-R). This strengthens the hypothesis that methylphenidate may preferentially not precipitate or exacerbate manic or psychotic symptoms in patients treated with antimanic or antipsychotic agents (Carlson et al. 1992; Scheffer et al. 2005; Findling et al. 2007). In all the trials, worsening of symptoms is seen as an exception more than as a rule. However, although significant changes in mood in the sample as whole were not detected, one patient needed hospitalization due to the onset of a severe mixed episode (YMRS=43, CMRS= 55) after the introduction of MPH 0.3 mg/kg/day. The severity of this episode suggests clinicians should be careful when both medications are used concomitantly, even though the episode may have been triggered by the natural course of the disorder itself, and not by MPH use.

Improvement of depressive symptoms was only observed by self-report measures. That is not an unexpected finding, due to a more appropriate report of internalizing symptoms by subjects themselves, unlikely of manic symptoms. (Herjanic & Reich 1982) Although this result was only found in a secondary measure making it impossible to exclude Type I error, this finding may warrant future studies of methylphenidate in unremitted bipolar depression after an antimanic agent has stabilized manic symptoms.

Methylphenidate was well tolerated, similarly of previous reports from ADHD studies (MTA 1999), and no particular side effect was responsible for dropouts in the trial. Weight changes did not significantly differ between methylphenidate and placebo. Aripiprazole did not significantly change weight in the early stages of this trial either, suggesting this combination may not promote significant weight changes, a very important clinical issue in the treatment of these subjects.

Our results should be seen in the context of some limitations: the small sample size may not have allowed us to detect significant differences between placebo and methylphenidate. However, it is important to note that other trials have also been conducted with the same sample size and found significant differences between methylphenidate and placebo (Findling et al. 2007). Important differences in the study design (methylphenidate doses, statistical analyses approach, use of antimanic agents other than atypical antipsychotics) may not enable us to compare ours to the results from those studies. The short-term duration of this trial may also be an important limitation for the observation of significant differences in adverse events between therapeutic agents.

This is the first randomized clinical trial assessing the effect of stimulants combined to atypical antipsychotics in the treatment of children and adolescents with

Juvenile Bipolar Disorder comorbid with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. Methylphenidate was not more effective than placebo in reducing attention or hyperactivity symptoms in this short-term trial. A secondary finding suggests that depressive symptoms can be ameliorated with the addition of methylphenidate to aripiprazole. Although methylphenidate was found not to destabilize bipolar disorder, its use should be considered with caution due to the fact one patient presented a severe mixed episode needing hospitalization during MPH treatment. Clearly, more studies are needed assessing use of methylphenidate combined to other antimanic agents in the quest for effective treatment for these very impairing comorbid conditions.



**Table 1: Sociodemographic and clinical characteristics of the participants**

Characteristic	Sample (n=16)	
	mean (SD)	% (N)
Age (in years):	10.94 (1.91)	
Ethnicity: (European-Brazilian):		75 (12)
Socioeconomic level: A + B+ C		87.5 (14)
D + E		12.5 (2)
Divorced parents:		62.5 (10)
School (mean grade):	3.31 (1.62)	
School repeats (years)	0.94 (1.06)	
Gender: (male)		62.5 (10)
Bipolar Disorder Type I		68.8 (11)
Type II		31.2 (5)
ADHD – Inattentive subtype		6.3 (1)
– Hyperactive subtype		12.5 (2)
– Combined subtype		81.3 (13)
Comorbidities:		
Anxiety Disorders		56.3 (9)
Conduct Disorder		56.3 (9)
Oppositional Defiant Disorder		81.3 (13)
Psychosis		43.8 (7)
Estimated IQ:	91.16 (12.56)	
Bipolar Disorder age at onset	6.56 (2.39)	
ADHD age at onset	4.13 (2.09)	
Baseline scores:		
YMRS	10.69 (9.00)	
CMRS-P	15.88 (11.58)	
SNAP-IV: Total score	1.59 (0.52)	
Inattention score	2.09 (0.44)	
Hyperactivity score	1.40 (0.65)	
Opposition score	1.25 (0.92)	
CDRS-R	29.75 (9.37)	
KADS	5.25 (3.89)	
CGI-S	2 (0.97)	
Adverse Events Count	4.81 (4.78)	
Barkley SAERS	40.19 (24.03)	
Weight	47.43 (15.68)	

Legend: ADHD: Attention Deficit/ Hyperactivity Disorder; IQ: Intelligence Quotient; YMRS: Young Mania Rating Scale; CMRS-P: Child Mania Rating Scale – Parental Version; SNAP-IV: Swanson, Nolan and Pelham Scale – version IV; CDRS-R: Children Depression Rating Scale – Reviewed; KADS: Kutcher Adolescent Depression Scale; CGI-S= Clinical Global Impression – Severity Scale; Barkley SAERS: Stimulant Adverse Events Rating Scale.

**Table 2. Mixed Effect Model Analyses for Effects of Methylphenidate vs. Placebo Combined to Aripiprazole on Outcome Measures in Children and Adolescents with Both Bipolar Disorder and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (n=14)**

<b>Primary Outcome Measures</b>	<b>Treatment</b>	<b>Period</b>	<b>Sequence</b>	<b>Dose-within- treatment</b>
<b>SNAP-IV Total Score</b>	$F_{1, 43.22} = 0.00$ $p$ value = <b>0.97</b>	$F_{1, 43.13} = 0.66$ $p$ value = <b>0.42</b>	$F_{1, 14.67} = 0.01$ $p$ value = <b>0.93</b>	$F_{1, 31.1} = 4.28$ $p$ value = <b>0.05</b>
<b>YMRS</b>	$F_{1, 40.19} = 0.93$ $p$ value = <b>0.34</b>	$F_{1, 40.19} = 2.09$ $p$ value = <b>0.16</b>	$F_{1, 12.01} = 0.06$ $p$ value = <b>0.81</b>	$F_{1, 40.23} = 0.64$ $p$ value = <b>0.43</b>
<b>CDRS-R</b>	$F_{1, 13.15} = 0.41$ $p$ value = <b>0.54</b>	$F_{1, 23.58} = 0.06$ $p$ value = <b>0.81</b>	$F_{1, 10.56} = 0.01$ $p$ value = <b>0.98</b>	$F_{1, 23.55} = 0.15$ $p$ value = <b>0.71</b>
<b>Secondary Outcome Measures</b>				
<b>CMRS-P</b>	$F_{1, 35.46} = 3.08$ $p$ value = <b>0.09</b>	$F_{1, 34.60} = 1.83$ $p$ value = <b>0.19</b>	$F_{1, 12.91} = 0.68$ $p$ value = <b>0.43</b>	$F_{1, 34.7} = 4.05$ $p$ value = <b>0.05</b>
<b>KADS</b>	$F_{1, 19.03} = 7.75$ $p$ value = <b>0.01</b>	$F_{1, 37.44} = 0.01$ $p$ value = <b>0.92</b>	$F_{1, 10.37} = 1.17$ $p$ value = <b>0.30</b>	$F_{1, 24.76} = 0.03$ $p$ value = <b>0.87</b>
<b>CGI-S</b>	$F_{1, 27.8} = 0.28$ $p$ value = <b>0.6</b>	$F_{1, 22.68} = 0.17$ $p$ value = <b>0.68</b>	$F_{1, 14.25} = 0.00$ $p$ value = <b>0.97</b>	$F_{1, 34.36} = 2.65$ $p$ value = <b>0.11</b>
<b>Adverse Events Count</b>	$F_{1, 27.07} = 2.61$ $p$ value = <b>0.12</b>	$F_{1, 38.79} = 0.91$ $p$ value = <b>0.35</b>	$F_{1, 14.80} = 0.02$ $p$ value = <b>0.89</b>	$F_{1, 30.38} = 1.08$ $p$ value = <b>0.31</b>
<b>SAERS</b>	$F_{1, 46.27} = 1.33$ $p$ value = <b>0.26</b>	$F_{1, 51.82} = 0.65$ $p$ value = <b>0.42</b>	$F_{1, 13.41} = 0.09$ $p$ value = <b>0.77</b>	$F_{1, 36.62} = 2.04$ $p$ value = <b>0.16</b>
<b>Weight</b>	$F_{1, 46.64} = 0.9$ $p$ value = <b>0.35</b>	$F_{1, 43.74} = 1.17$ $p$ value = <b>0.29</b>	$F_{1, 15.73} = 3.44$ $p$ value = <b>0.08</b>	$F_{1, 32.5} = 0.84$ $p$ value = <b>0.37</b>

SNAP-IV: Swanson, Nolan and Pelham Scale – version IV; YMRS: Young Mania Rating Scale; CDRS-R: Children Depression Rating Scale – Reviewed; CMRS-P: Child Mania Rating Scale – Parental Version; KADS: Kutcher Adolescent Depression Scale; CGI-S= Clinical Global Impression Scale – Severity Subscale; SAERS: Barkley Stimulant Adverse Events Rating Scale.

**Table 3. Barkley's Stimulants Adverse Events Rating Scale (SAERS) scores\***

Adverse Event	Baseline	Group A			
		Week 1 Placebo	Week 2 Placebo	Week 3 MPH 0.3mg/kg/day	Week 4 MPH 0.7mg/kg/day
Insomnia or trouble falling asleep	0.00 (0.00)	5.00 (3.74)	3.83 (4.45)	6.17 (4.88)	3.67 (3.67)
Nightmares	2.33 (3.83)	1.67 (1.97)	1.83 (3.60)	1.33 (3.27)	0.00 (0.00)
Stares or "dreams awake"	3.33 (2.66)	2.00 (3.52)	2.33 (3.50)	3.33 (3.08)	4.83 (4.36)
Speaks less to others	3.00 (3.35)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.83 (2.04)	1.33 (2.16)
Uninterested by others	2.83 (2.32)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.83 (2.04)	3.33 (3.61)
Appetite Loss	0.83 (2.04)	4.83 (3.97)	4.00 (4.43)	3.33 (4.18)	4.00 (4.52)
Irritable	3.83 (3.06)	5.33 (4.27)	3.67 (3.44)	4.67 (3.50)	6.17 (4.07)
Stomachaches	1.00 (2.45)	1.33 (2.80)	1.17 (2.40)	2.83 (3.76)	2.67 (4.18)
Headaches	2.00 (2.76)	1.33 (2.80)	1.00 (1.26)	1.67 (3.61)	0.50 (1.22)
Sleepiness	3.67 (2.34)	2.50 (3.21)	0.67 (1.21)	2.17 (2.48)	1.17 (2.86)
Sad/Unhappy	1.50 (2.35)	1.17 (2.86)	0.50 (0.84)	1.50 (3.67)	1.50 (3.67)
Cries easily	3.00 (3.35)	2.83 (3.66)	3.17 (4.22)	3.00 (3.46)	2.33 (3.01)
Anxious	2.33 (3.83)	0.50 (0.84)	2.50 (3.99)	2.50 (3.73)	4.50 (4.04)
Nail biting	2.17 (3.25)	0.83 (2.04)	0.00 (0.00)	1.50(3.67)	0.83 (2.04)
Euphoric/Excessively happy	3.50 (3.45)	3.00 (4.65)	2.17 (3.71)	2.67 (3.67)	3.33 (4.46)
Dizziness	1.83 (2.99)	1.50 (3.67)	1.00 (2.00)	2.50 (3.89)	0.83 (2.04)
Tics	2.33 (3.83)	4.50 (4.93)	4.00 (4.52)	3.17 (3.97)	5.33 (4.13)
SAERS Total Score	39.50 (26.70)	39.17 (33.25)	31.83 (29.98)	42.50 (32.04)	46.33 (27.08)
Adverse Event	Baseline	Group B			
		Week 1 MPH 0.3mg/kg/day	Week 2 MPH 0.7mg/kg/day	Week 3 Placebo	Week 4 Placebo
Insomnia or trouble falling asleep	0.00 (0.00)	0.88 (2.48)	2.13 (3.27)	0.00 (0.00)	0.38 (1.06)
Nightmares	0.29 (0.76)	0.63 (1.19)	0.38 (1.06)	0.00 (0.00)	2.00 (3.74)
Stares or "dreams awake"	3.57 (2.99)	5.00 (2.73)	4.13 (2.85)	4.63 (3.54)	3.88 (4.22)
Speaks less to others	4.57 (3.69)	4.13 (3.64)	2.13 (3.23)	3.13 (3.72)	3.88 (3.48)
Uninterested by others	2.86 (3.76)	3.50 (3.82)	3.00 (3.74)	3.50 (3.63)	3.50 (3.63)
Appetite Loss	4.14 (4.38)	1.38 (2.56)	1.00 (2.83)	1.63 (3.29)	2.63 (3.78)
Irritable	2.57 (2.99)	5.75 (3.06)	4.25 (4.13)	3.75 (4.17)	4.63 (3.62)
Stomachaches	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	1.75 (3.28)	0.38 (1.06)	1.75 (3.41)
Headaches	1.29 (1.98)	2.63 (3.66)	1.50 (2.78)	0.50 (1.41)	1.75 (3.41)
Sleepiness	1.14 (3.02)	1.88 (3.56)	1.25 (3.15)	3.50 (4.04)	2.50 (3.55)
Sad/Unhappy	2.14 (2.85)	1.50 (2.98)	2.13 (3.64)	1.88 (3.04)	4.88 (4.09)
Cries easily	3.14 (4.02)	3.25 (3.65)	2.25 (3.41)	3.13 (3.09)	3.25 (3.99)
Anxious	5.43 (3.41)	4.13 (3.76)	3.25 (3.69)	4.38 (3.62)	3.00 (3.30)
Nail biting	2.29 (3.95)	4.13 (4.52)	3.38 (4.66)	6.00 (3.82)	4.50 (4.81)
Euphoric/Excessively happy	2.86 (3.08)	2.00 (3.16)	1.50(2.83)	2.25 (3.41)	0.00 (0.00)
Dizziness	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.38 (1.06)	0.00 (0.00)	0.25 (0.71)
Tics	1.43 (2.70)	3.00 (3.34)	3.13 (4.09)	3.13 (3.80)	2.00 (3.07)
SAERS Total Score	39 (24.63)	43.5 (16.52)	38.12 (18.59)	41.75 (22.49)	44.75 (29.05)

\* Scores are presented as means (standard deviation). Scores in each item of the SAERS range from 0 (absent adverse event) to 9 (severe).

## References

- American Academy of Child and Adolescent Psychiatry Official Action: Practice Parameter for the Assessment and Treatment of Children and Adolescents With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 46: 894-921, 2007.
- American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed. Washington (DC), American Psychiatric Press, 1994.
- Axelson D, Birmaher B, Strober M, Gill MK, Valeri S, Chiappetta L, Ryan N, Leonard H, Hunt J, Iyengar S, Bridge J, Keller M: Phenomenology of children and adolescents with bipolar spectrum disorders. *Arch Gen Psychiatry* 63:1139-1148, 2006.
- Barbosa GA, Dias MD, Gaião AA, Di Lorenzo WF: Escala para avaliação de depressão em crianças - revisada (CDRS-R): uma análise exploratória. *Infanto* 1:15-18, 1997.
- Barkley RA, McMurray MB, Edelbrock CS, Robbins K. Side effects of methylphenidate in children with attention deficit hyperactivity disorder: a systemic, placebo-controlled evaluation. *Pediatrics* 86:184-192, 1990.
- Biederman J, Mick E, Prince J, Bostic JQ, Wilens TE, Spencer T, Wozniak J, Faraone SV: Systematic chart review of the pharmacologic treatment of comorbid attention deficit hyperactivity disorder in youth with bipolar disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 9:247-256, 1999.
- Brooks SJ, Krulewicz SP, Kutcher S: The Kutcher Adolescent Depression Scale: assessment of its evaluative properties over the course of an 8-week pediatric pharmacotherapy trial. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 13:337-349, 2003.

Carlson GA, Rapport MD, Kelly KL, Pataki CS: The effects of methylphenidate and lithium on attention and activity level. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 31:262-270, 1992.

Cherland E, Fitzpatrick R: Psychotic side effects of psychostimulants: a 5-year review. *Can J Psychiatry* 44:811-813, 1999.

Consoli A, Bouzamondo A, Guilé JM, Lechat P, Cohen D: Comorbidity with ADHD decreases response to pharmacotherapy in children and adolescents with acute mania: evidence from a metaanalysis. *Can J Psychiatry* 52:323-328, 2007.

Findling RL, Short EJ, McNamara NK, Demeter CA, Stansbrey RJ, Gracious BL, Whipkey R, Manos MJ, Calabrese JR: Methylphenidate in the treatment of children and adolescents with bipolar disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 46:1445-1453, 2007.

Galanter CA, Leibenluft E: Frontiers between Attention Deficit Hyperactivity Disorder and Bipolar Disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 17:325-346, 2008.

Greenhill LL, Vitiello B, Fisher P, Levine J, Davies M, Abikoff H, Chrisman AK, Chuang S, Findling RL, March J, Scahill L, Walkup J, Riddle MA: Comparison of increasingly detailed elicitation methods for the assessment of adverse events in pediatric psychopharmacology. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 43:1488-1496, 2004.

Guy W: Clinical Global Impressions (CGI) Scale. APA Task Force for the Handbook of Psychiatric Measures. 2000.

Herjanic B, Reich W.: Development of a structured psychiatric interview for children: agreement between child and parent on individual symptoms. *J Abnorm Child Psychol* 10: 307-324, 1982.

- Koehler-Troy C, Strober M, Malenbaum R: Methylphenidate-induced mania in a prepubertal child. *J Clin Psychiatry* 47:566-567, 1986.
- Kowatch RA, Sethuraman G, Hume JH, Kromelis M, Weinberg WA: Combination pharmacotherapy in children and adolescents with bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 53:978-984, 2003.
- Kowatch RA, Youngstrom EA, Danielyan A, Findling RL: Review and meta-analysis of the phenomenology and clinical characteristics of mania in children and adolescents. *Bipolar Disord* 7:483-496, 2005a.
- Kowatch RA, Fristad M, Birmaher B, Wagner KD, Findling RL, Hellander M; Child Psychiatric Workgroup on Bipolar Disorder: Treatment guidelines for children and adolescents with bipolar disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 44:213-235, 2005b.
- Mattos P, Serra-Pinheiro M, Rohde L, Pinto D: Apresentação de uma versão em português para uso no Brasil do instrumento MTA-SNAP-IV de avaliação de sintomas de transtorno do déficit de atenção/hiperatividade e sintomas de transtorno desafiador e de oposição. *Rev Psiquiatr RS* 28:290-297, 2006.
- McClellan J, Kowatch R, Findling RL: Practice Parameter for the Assessment and Treatment of Children and Adolescents With Bipolar Disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 46:107-125, 2007.
- MTA Cooperative Group: A 14-month randomized clinical trial of treatment strategies for attention-deficit/hyperactivity disorder. The MTA Cooperative Group. Multimodal Treatment Study of Children with ADHD. *Arch Gen Psychiatry* 56:1073-1086, 1999.

- Orvaschel H: Psychiatric interviews suitable for use in research with children and adolescents. *Psychopharmacol Bull* 21:737-745, 1985.
- Pavuluri MN, Henry DB, Devineni B, Carbray JA, Naylor MW, Janicak PG: A pharmacotherapy algorithm for stabilization and maintenance of pediatric bipolar disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 43:859-867, 2004.
- Pavuluri MN, Henry DB, Devineni B, Carbray JA, Birmaher B: Child mania rating scale: development, reliability, and validity. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 45:550-560, 2006.
- Poznanski EO, Cook SC, Carroll BJ: A depression rating scale for children. *Pediatrics* 64:442-450, 1979.
- Scheffer RE, Kowatch RA, Carmody T, Rush AJ: Randomized, placebo-controlled trial of mixed amphetamine salts for symptoms of comorbid ADHD in pediatric bipolar disorder after mood stabilization with divalproex sodium. *Am J Psychiatry* 162:58-64,.
- Strober M, DeAntonio M, Schmidt-Lackner S, Freeman R, Lampert C, Diamond J: Early childhood attention deficit hyperactivity disorder predicts poorer response to acute lithium therapy in adolescent mania. *J Affect Disord* 51:145-151, 1998.
- Szobot CM, Rohde LA, Katz B, Ruaro P, Schaefer T, Walcher M, Bukstein O, Pechansky F: A randomized crossover clinical study showing that methylphenidate-SODAS improves attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms in adolescents with substance use disorder. *Braz J Med Biol Res* 41:250-257, 2008.
- Tramontina S, Schmitz M, Polanczyk G, Rohde LA: Juvenile bipolar disorder in Brazil: clinical and treatment findings. *Biol Psychiatry* 53:1043-1049, 2003.

Tramontina S, Zeni CP, Pheula GF, de Souza CK, Rohde LA: Aripiprazole in juvenile bipolar disorder comorbid with attention-deficit/hyperactivity disorder: an open clinical trial. *CNS Spectr* 12:758-762, 2007.

Vilela JA, Crippa JA, Del-Ben CM, Loureiro SR: Reliability and validity of a Portuguese version of the Young Mania Rating Scale. *Braz J Med Biol Res* 38:1429-1439, 2005.

Wechsler D: WISC-III/Manual. New York (NY), The Psychological Corporation, 1991.

Wilens TE, Biederman J, Kwon A, Ditterline J, Forkner P, Moore H, Swezey A, Snyder L, Henin A, Wozniak J, Faraone SV: Risk of substance use disorders in adolescents with bipolar disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 43:1380-1386, 2004.

Wozniak J, Biederman J, Kiely K, Ablon JS, Faraone SV, Mundy E, Mennin D: Mania-like symptoms suggestive of childhood-onset bipolar disorder in clinically referred children. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 34:867-876, 1995.

Youngstrom EA, Danielson CK, Findling RL, Gracious BL, Calabrese JR: Factor structure of the Young Mania Rating Scale for use with youths ages 5 to 17 years. *J Clin Child Adolesc Psychol* 31:567-572, 2002.

Zeni CP, Guimarães AP, Polanczyk GV, Genro JP, Roman T, Hutz MH, Rohde LA: No significant association between response to methylphenidate and genes of the dopaminergic and serotonergic systems in a sample of Brazilian children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B:391-394, 2007.



## CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudamos, nessa tese, o papel de fatores biológicos (no caso, o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro - BDNF) na diferenciação entre Transtorno de Humor Bipolar e o transtorno mental comórbido mais freqüente (Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade). Foram avaliadas diferenças na transmissão do gene e nos níveis séricos do BDNF entre pacientes com THB+TDAH, TDAH e controles. Também foi avaliada a resposta ao tratamento com estimulantes quando da presença da comorbidade entre THB e TDAH.

É importante salientar que a presença de altas taxas de comorbidade nas populações psiquiátricas demonstra a limitação dos sistemas classificatórios atuais. A ausência de características biológicas mensuráveis como critérios diagnósticos gera heterogeneidade e conseqüentes incertezas e artefatos na interpretação dos resultados. A constante evolução do DSM e da CID e a busca por marcadores específicos podem, em longo prazo, fornecer respostas sobre cada um dos transtornos. Devido à superposição dos sintomas, a tentativa de avaliá-los dimensionalmente (ao invés da visão categórica atual) pode ser válida. Entretanto, são necessários imensos tamanhos amostrais, provavelmente impossíveis sem estudos colaborativos multicêntricos, na tentativa de avaliar a associação entre cada um dos sintomas e um correlato neurobiológico.

Apontamos que o BDNF provavelmente não deverá tornar-se um marcador específico para algum dos transtornos mentais como os classificamos atualmente. Há pesquisas com pacientes com Esquizofrenia, Transtorno Bipolar, Estado de Estresse Pós-Traumático e Uso de Substâncias, entre outros, demonstrando diferenças significativas entre os grupos de pacientes e indivíduos hígidos. Não é observada especificidade para

transtorno ou região cerebral, apesar da alta correlação dos níveis cerebrais e periféricos do BDNF. Além desses fatores, apesar da sua ligação direta com o glutamato, também há interação com sistemas serotoninérgicos e dopaminérgicos. Muito há por ser desvendado em relação à essa neurotrofina.

Pelas questões expostas acima, apesar do grande esforço de vários grupos de pesquisadores, ainda não chegamos ao ponto no qual a medicina translacional possa fazer uma contribuição significativa aos sistemas classificatórios. Modelos animais podem ser extremamente valiosos na busca de maior conhecimento das alterações de regiões cerebrais específicas.

Na investigação da transmissão do polimorfismo Val66Met no gene do BDNF em crianças e adolescentes com THB, não foi detectada uma diferença significativa na transmissão alélica. Tampouco houve diferenças quando avaliamos pacientes com TDAH. Nossos resultados somam-se aos de outros pesquisadores sugerindo que este polimorfismo pode não estar associado ao THB ou ao TDAH.

Apesar de não termos detectado diferença significativa nos níveis séricos da proteína do BDNF de acordo com os genótipos do BDNF nos pacientes com THB, os níveis séricos diferenciaram significativamente pacientes com THB+TDAH dos pacientes com TDAH. Esse é um dos primeiros achados que pode auxiliar no entendimento das diferenças neurobiológicas do THB+TDAH e do TDAH. Esses resultados indicam que o BDNF deve ser mais estudado também nesta faixa etária, e, caso haja uma replicação consistente deste achado, que possa vir a ser utilizado como marcador biológico na diferenciação diagnóstica entre essas condições. Sugere-se, ainda, a realização de estudos com enzimas oxidativas ou outros marcadores do metabolismo cerebral. Também deve

ser investigado o papel de marcadores ligados à dopamina, como o CDFN (Cerebral Dopamine Neurotrophic Factor), cujo papel é proteger e restaurar a função de neurônios dopaminérgicos em várias regiões cerebrais, dada a importância dos circuitos dopaminérgicos no TDAH.

No estudo de tratamento da comorbidade entre THB e TDAH, a ausência de resposta ao metilfenidato nos sintomas de TDAH em pacientes que apresentam a comorbidade reforça a evidência de que há pior resposta ao tratamento neste grupo, dado o elevado tamanho de efeito do metilfenidato no tratamento do TDAH em isolado. É possível que o aripiprazol, por ser um agonista parcial dopaminérgico, possa ter interferido na ação do metilfenidato.

Nosso trabalho apresentou algumas limitações. Grande parte dos pacientes apresentava-se em episódios de humor, assim como muitos já estavam medicados quando da entrada nos estudos. A alta taxa de comorbidade do THB com TDAH, também observada, é regra nos estudos do THBIA. Entretanto, acreditamos que a alta taxa de comorbidade possa ser um ponto forte de nossa investigação, pois possibilita o estudo da diferenciação de condições fenotipicamente semelhantes.

Os resultados destes estudos nos levaram a tentar replicar em crianças e adolescentes outros trabalhos realizados com o gene do BDNF em adultos com THB. (Ver Artigo suplementar) A participação do BDNF nos processos de memória e cognição, e sua associação com o THB, sugerem que as medidas nestes processos mediados pelo gene possam constituir um endofenótipo do THB. Foi comparado o desempenho no Wisconsin Card Sorting Test, que avalia o funcionamento das áreas frontal e pré-frontal através de testes de memória de trabalho e funções executivas, entre

os portadores do alelo Met e os homozigotos no alelo Val do polimorfismo Val66Met no gene do BDNF. Nos estudos em adultos, os portadores do alelo Met apresentaram pior performance. Em crianças e adolescentes, encontramos que o gene do BDNF não exerceu impacto significativo no resultado do Wisconsin Card Sorting Test. Entendemos que, assim como ocorreu com os níveis séricos e os especificadores to THB, é possível que as alterações dos testes neuropsicológicos não estejam presentes ou não sejam mensuráveis através do teste utilizado devido ao desenvolvimento cerebral, que está em andamento nesta faixa etária.

Concluimos que a pesquisa de fatores biológicos para um melhor entendimento da psicopatologia e conseqüente diferenciação dos transtornos mentais tem extrema relevância porque a identificação destes fatores tem o potencial de auxiliar na elaboração de tratamentos mais precisos, urgentemente necessários devido às graves conseqüências do THB e do TDAH nas vidas dos pacientes e de suas famílias.

A criação de um programa específico para Crianças e Adolescentes com Transtorno Bipolar (ProCAB) e de uma linha de pesquisa com foco na etiologia e tratamento possibilitam uma constante geração de conhecimento nesta área, onde poucos estudos estão disponíveis. Atualmente com três anos de funcionamento, o ProCAB promove avaliação de fatores ambientais e genéticos, avaliação multidisciplinar e acompanhamento longitudinal. Como parte de meu trabalho de doutorado, participei da organização do programa, da criação do protocolo e do planejamento das pesquisas realizadas. Atualmente, está sendo escrito um artigo para a Revista Brasileira de Psiquiatria com a descrição do processo de avaliação e acompanhamento do ProCAB,

que tem a parceria e execução simultânea de outro grupo em São Paulo (PROMAN), visando criar uma rede para a geração de dados.

Nosso trabalho, que inclui essa tese, tem por objetivo ajudar a amenizar os graves prejuízos que crianças e adolescentes podem apresentar ao longo de todo o seu desenvolvimento, seja através do atendimento clínico ou da presente produção de conhecimento, visando um melhor entendimento da doença. Esperamos ter gerado avanços nessa direção.

**ANEXOS**

Anexo a. Artigo Suplementar

Título em Português: O Polimorfismo Val66Met do Gene Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro não Influencia os Resultados no Wisconsin Card Sorting Test em Crianças e Adolescentes com Transtorno Bipolar

Título em Inglês: The Val66Met Polymorphism at the Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene does not influence Wisconsin Card Sorting Test Results in Children and Adolescents with Bipolar Disorder

Em segunda revisão na Revista Brasileira de Psiquiatria

**The Val66Met Polymorphism at the Brain-Derived Neurotrophic Factor Gene does not influence Wisconsin Card Sorting Test Results in Children and Adolescents with Bipolar Disorder**

**O Polimorfismo Val66Met do Gene Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro não influencia os resultados no Wisconsin Card Sorting Test em Crianças e Adolescentes com Transtorno Bipolar**

Running Head: BDNF and WCST in Juvenile Bipolar Disorder

Cristian Patrick Zeni<sup>1</sup>, Silzá Tramontina<sup>1</sup>, Thamís Aline Zeni<sup>1</sup>, Roberta Coelho<sup>1</sup>, Gabriel Pheula<sup>1</sup>, Julio Bernardi<sup>1</sup>, Ursula Maldaner<sup>1</sup>, Talita Lopes Silva<sup>1</sup>, Angélica Salatino-Oliveira<sup>2</sup>, Mara Hutz<sup>2</sup>, Luis Augusto Rohde<sup>1,3</sup>.

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

<sup>2</sup> Department of Genetics and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

<sup>3</sup> Institute for Developmental Psychiatry for Childhood and Adolescence, Brazil.

**Corresponding author:** Dr. Luis Augusto Rohde, Serviço de Psiquiatria da Infância e Adolescência, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Zip code: 90035-903. Tel/fax: +55-51-33598094. E-mail: [lrohde@terra.com.br](mailto:lrohde@terra.com.br)

**Abstract and key words**

**Objectives:** to assess the role of the Val66Met polymorphism at the Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) gene on the performance of children and adolescents with Bipolar Disorder (JBD) in the Wisconsin Card Sorting Test (WCST).

**Methods:** children and adolescents were assessed by the K-SADS-PL and clinical evaluation for BD and comorbid conditions. Manic and depressive symptoms were assessed with the Young Mania Rating Scale and the Children Depression Rating Scale – Reviewed. A blood sample was collected, and the Val66Met polymorphism at the Brain-Derived Neurotrophic Factor was genotyped. Patients had their IQ estimated and executive functions assessed by a standard frontal lobe test (WCST).

**Results:** Fifty-three subjects were included in the study. No significant difference was observed between the Val/Val and Val/Met+Met/Met groups on any WCST scores in the MANCOVA ( $F_{48,5}=0.76$ ;  $p=0.59$ ; specific categories: Perseverative Errors –  $p=0.66$ ; Nonperseverative Errors –  $p=0.58$ ; Categories Completed –  $p=0.34$ ; Attempts to Reach First Category –  $p=0.64$ ; and Percentage of Conceptual Level Responses –  $p=0.99$ ).

**Conclusions:** Our findings in children and adolescents with BD do not replicate results from adult studies, reinforcing the existence of differences in the neurobiology of the disorder across the life cycle. Investigations of larger samples are necessary to confirm these data.

**Key words:** BDNF, Bipolar Disorder, Children, Adolescents, Wisconsin Card Sorting Test



## Funding Sources

<b>Membro do grupo de autores</b>	<b>Local de trabalho</b>	<b>Verba de pesquisa<sup>1</sup></b>	<b>Outro apoio à pesquisa ou educação médica continuada<sup>2</sup></b>	<b>Honorários de palestrante</b>	<b>Participação acionária</b>	<b>Consultor/ Conselho consultivo</b>	<b>Outro<sup>3</sup></b>
Cristian Patrick Zeni	-	FIPE-HCPA	Abbott Novartis	-	-	-	-
Silzá Tramontina	HCPA	-	-	Abbott	-	-	-
Thamis Aline Zeni	-	-	-	-	-	-	-
Roberta Coelho	-	-	-	-	-	-	-
Gabriel Pheula	UFRGS	-	Abbott	-	-	-	-
Julio Bernardi	-	-	-	-	-	-	-
Ursula Maldaner	-	-	-	-	-	-	-
Talita Lopes Silva	-	-	-	-	-	-	-
Angélica	-	-	-	-	-	-	-
Salatino-Oliveira	-	-	-	-	-	-	-
Mara Hutz	UFRGS	-	-	-	-	-	-
Luis Augusto Rohde	UFRGS	-	Abbott, Bristol-Myers Squibb, Eli-Lilly, Janssen-Cilag, Novartis, and Shire	Eli-Lilly, Janssen-Cilag, Novartis, and Shire	-	Eli-Lilly, Janssen-Cilag, Novartis, and Shire	Artmed e Oxford Press

This work was supported by a research grant from Hospital de Clínicas de Porto Alegre

(GPPG 07-642).

**Resumo e palavras-chave**

**Objetivo:** avaliar o papel do polimorfismo Val66Met do gene Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) no desempenho de crianças e adolescentes com Transtorno Bipolar (THB) no Wisconsin Card Sorting Test (WCST).

**Métodos:** crianças e adolescentes foram avaliados através do K-SADS-PL e de acompanhamento clínico para THB e comorbidades. Sintomas maníacos e depressivos foram avaliados pela Young Mania Rating Scale e pela Children Depression Rating Scale – Reviewed. Amostras de sangue foram coletadas e o polimorfismo Val66Met no gene BDNF foi genotipado. Os pacientes tiveram seu QI estimado e a função executiva avaliada por um teste standard do lobo frontal (WCST).

**Resultados:** cinquenta e três indivíduos foram incluídos no estudo. Não foi observada diferença significativa entre os grupos Val/Val e Val/Met + Met/Met em nenhuma das categorias do WCST na MANCOVA ( $F_{48,5}=0.76$ ;  $p=0.59$ ; categorias específicas: Erros Perseverativos –  $p=0.66$ ; Erros Não-Perseverativos –  $p=0.58$ ; Categorias Completadas –  $p=0.34$ ; Número de Tentativas para Atingir a Primeira Categoria –  $p=0.64$ ; e Porcentagem de Respostas de Nível Conceitual –  $p=0.99$ ).

**Conclusão:** nossos achados em crianças e adolescentes com THB não reproduziram os resultados de estudos com adultos, reforçando a existência de diferenças na neurobiologia do transtorno ao longo do ciclo de vida. Estudos com amostras maiores são necessários para confirmar esses dados.

**Palavras-chave:** BDNF, Transtorno Bipolar, Crianças, Adolescentes, Wisconsin Card Sorting Test

## Introduction

Children and adolescents with Bipolar Disorder (Juvenile Bipolar Disorder – JBD) present disabling affective and behavioral dysregulation, aggressiveness, and irritability.<sup>(1,2)</sup> These severe mood swings cause significant impairment along development. Current studies estimate BD prevalence in around 0,6-1% of children and adolescents.<sup>(3)</sup> The early-onset population (Juvenile Bipolar Disorder-JBD) presents a higher propensity to suicidality, psychosis, exposure to sexual risks and drug use.<sup>(4,5,6)</sup> JBD is also associated to a low symptom remission rate and elevated mood crises recurrence.<sup>(7,8)</sup>

Neuropsychological studies of adults with BD have helped to understand the neurobiological underpinnings of the disorder revealing deficits in set shifting, planning, working memory, resistance to interference, sustained attention, verbal learning, and memory.<sup>(9)</sup> Neuroimaging investigations suggest some brain areas such as frontolimbic cortex to be implicated in these alterations.<sup>(10)</sup> Tests like the Wisconsin Card Sorting Test (WCST), which assess the prefrontal lobe activity, may confirm the neural circuitry involved in BD deficits. Some investigations on JBD were conducted using this neuropsychological tool.<sup>(9,11)</sup> A recent investigation of 15 euthymic JBD Type I or II subjects (mean age: 16,4 years) reported they had a significantly higher score in nonperseverative errors in the WCST when compared to healthy controls (n=15) ( $p = 0.038$ ).<sup>(11)</sup> Another group of investigators compared differences in the WCST performance between JBD children and adolescents (n=57) and controls (n=46), and reported trends for differences in perseverative errors, nonperseverative errors and categories completed in WCST subtests, after controlling for Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. (Doyle et al., 2006)

The Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) is acknowledged as having an important role in neuronal growth, survival, and differentiation during the development.<sup>(12)</sup> It is also

involved in the learning and memory processes. A positive association has been detected between the BDNF gene and JBD. <sup>(13)</sup>

The BDNF Val66Met polymorphism seems to influence the performance of adult patients in the WCST, suggesting that this measure can be used as an endophenotype for BD. In a previous study, adult patients with BD (n=54) presenting the Met allele (n=10) showed a worse performance in the WCST in all of its subtests than patients homozygous for the Val allele (n=44). <sup>(14)</sup> A subsequent study with an enlarged sample corroborated the previous conclusions and suggested specificity of the effect of the Met allele in WCST for BD in a comparison with schizophrenic patients (n=129) and a control group (n=160). The Met allele was also associated to a worse WCST performance only in BD patients (n=111). <sup>(15,16)</sup>

Despite the differences identified in the neuropsychological profile of the JBD subjects according to BDNF genotype and the potential of BDNF in neurodevelopment, few studies addressed these issues, and to our knowledge no previous research investigated the association of cognitive performance in JBD and the BDNF gene. The aim of this investigation was to assess the performance of children and adolescents with BD in the WCST according to their BDNF Val66Met polymorphism status. Our hypothesis is that subjects presenting the Met allele at the BDNF will show a worse performance in the WCST than those who present the homozygosity of the Val allele.

## **Patients, Materials, and methods**

Recruitment was performed in different ways: a) from the community through press releases; b) from other ongoing JBD studies; c) from the ProCAB (Outpatient Program for Children and Adolescents with Bipolar Disorder). Inclusion criteria were: a) age ranging from 5 to 17 years; and b) diagnoses of BD according to DSM-IV criteria;<sup>(17)</sup> Exclusion criteria were: a) diagnoses of Pervasive Developmental Disorder, Schizophrenia and Substance Abuse or Dependence; and b) severe suicide/homicide risk counter indicating outpatient treatment. Parental written informed consent and children verbal assent were obtained. This study was approved by the ethical committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (approved as an IRB by the "Office for Human Research Protections, United States of America - IRB 00000921"), and is in accordance with the Helsinki Declaration of 1975. The ProCAB is registered at [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) under the identifier NCT00116259.

### **Diagnostic ascertainment**

Diagnostic assessment was conducted through a three-stage process. First, a child and adolescent psychiatrist with extensive training (GFP) interviews primary caregivers assessing the presence of DSM-IV mood symptoms, and family history of psychiatric disorders. If subjects fulfill DSM-IV criteria for Bipolar I, Bipolar II, or Bipolar NOS, they go through neuropsychological and learning disorders assessments. In addition, subjects were assessed with the K-SADS-PL (Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children-Present and Lifetime Version) by trained interviewers.<sup>(18)</sup> The K-SADS-PL training process in our center consisted in several seminars about both child psychopathology in general and the structure of the instrument, live observation of 5 interviews performed by trained research assistants, and live administration of the K-SADS-PL interview in 5 patients with the presence of trained observers. Finally, research assistants performed reliability analyses based in previous KSDAS interviews recorded in videotape. Kappa coefficient was calculated as 0.93 for mood

disorders in a previous study.<sup>(19)</sup> Patients and parents answer separately the mood and substance use modules, and together the other modules. Another child and adolescent psychiatrist performs a clinical evaluation of BD and comorbid conditions using DSM—IV criteria with parents and subjects, checking also the positive diagnoses derived from K-SADS-PL. Finally, after the entire clinical assessment, best estimate diagnoses are achieved through a discussion with the whole research group. Priority is always given for the final clinical diagnoses formulated if a diagnostic disagreement occurred in this process.

### **Symptom Measures**

Mania symptoms were assessed with the Young Mania Rating Scale (YMRS).<sup>(20)</sup> This is an 11-item scale for the assessment of severity of mania symptoms that has similar efficiency across different age groups, including youths aged 4-17 years. The YMRS was translated and validated into Portuguese (Kappa 0.32-0.91, intraclass correlation coefficient 0.8).<sup>(21)</sup> Presence and severity of depressive symptoms were rated using the Brazilian version of the Children Depression Rating Scale – Reviewed (CDRS-R).<sup>(22,23)</sup>

Mood states were defined as follows: mania (YMRS  $\geq 7$  and CDRS-R  $< 28$ ), depression (YMRS  $< 7$  and CDRS-R  $\geq 28$ ), and euthymia (YMRS  $< 7$  and CDRS-R  $< 28$ ).<sup>(23,24)</sup>

### **Genotyping**

The genotyping of Val66Met polymorphism was done with PCR method as described by Neves-Pereira et al.<sup>(25)</sup> Blood (5 ml) was drawn from each subject, and DNA was extracted by use of the high-salt method.<sup>(26)</sup> Subjects were genotyped for the BDNF Val66Met SNP that determines a valine-to-methionine substitution at position 66 in the coding region. The SNP for the G→A (valine→methionine) variation at position 758 of the BDNF coding sequence was selected from the National Center for Biotechnology Information SNP database (reference number rs6265). A 113-bp segment was amplified by PCR, using the following primers: 5-GAGGCTTGACATCATTGGCT-3 and 5-CGTGTACAAGTCTGCGTCCT-3. Target sequences

were amplified in a 25-ml reaction solution containing 125 ng genomic DNA; 1 U Taq polymerase (Sigma-Aldrich); 20 mM Tris-HCl (pH 8.4); 50 mM KCl; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 mM each of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP; and 10 pmol of each primer. After an initial denaturation of the DNA templates for 5 min at 95°C, 30 cycles were performed, each consisting of 94°C for 30s, 60°C for 30s, and 72°C for 30s. After the last cycle, samples were incubated at 72°C for 5 min. Samples were then digested overnight with 3 U of Eco721 (MBI Fermentas). The fragments were separated on a 3.5% agarose gel at 100V, and fragments were visualized with ethidium bromide. The uncut product size was 113 bp (allele A), and allele G comprised the cut bands of 78 and 35 bp.

### **Neuropsychological Assessment**

Intelligence Estimation (IQ). The Vocabulary and Block Design subsets of the Wechsler intelligence scale for children – Third Version (WISC-III) was used to estimate Full Scale IQ. <sup>(27)</sup>

The Wisconsin Card Sorting Test (WCST) is a neuropsychological test that addresses functions mostly connected with the prefrontal lobe activity. <sup>(28)</sup> The ability to change the reaction due to unawareness of relevant stimuli is measured by the percentage of perseverative errors (WCST-P), the attentional inability to avoid distraction is given by the percentage of nonperseverative errors (WCST-NP), the ability to utilize new information and previous experiences is measured by the number of correctly completed categories (WCST-CC), the set to the first category informs the ability to formulate a logical conception (WCST-1stCAT), and the ability to form a conceptual thinking is measured by the percentage of conceptual level responses (WCST-%CONC). This set of executive functions evaluates abstract thinking and the ability to create problem-solving strategies in response to changing stimuli conditions. The test has been adapted for the Brazilian population. <sup>(29)</sup>

### **Statistical Analyses**

Statistical Analyses were performed using the software SPSS for Windows, version 18. Clinical and demographic characteristics were considered confounders and entered as covariables in models when associated with both the independent factor (presence or absence of the met allele at the BDNF gene) and the outcome measure (WCST subtest scores) for a flexible p value of 0.2. To evaluate normality distribution of the variables, the Shapiro–Wilk test was applied. Differences between the two groups of patients were assessed by the Student’s t-test in case of normal distribution or otherwise by the nonparametric Mann–Whitney test. Correlations were tested with Spearman’s rho or Pearson’s r, according to the sample distributions. Differences between the Val/Val and the Val/Met-Met/Met carriers at the BDNF Val66Met polymorphism were analyzed using Multiple Analysis of Covariance (MANCOVA) models, which included terms for covariables. All tests of hypotheses used a two-sided alpha = 0.05.



## Results

A total of 53 subjects were included in the study. Demographics and clinical characteristics, as well as measures of symptom severity are presented in Table 1. No significant difference was observed between genotype groups. Due to the design of our outpatient program (a naturalistic setting), patients usually perform neuropsychological testing symptomatic. However, symptom rates or mood states did not differ between groups. One third of the patients (16 out of 53) were using either mood stabilizers or atypical antipsychotics by time of evaluation (data available under request).

INSERT TABLE 1 HERE

The Val/Val genotype composed 75.5% of the sample (40 subjects), the Val/Met genotype 22.6% (12 subjects), and Met/Met only 1.9% (1 subject). In male subjects (n=33), 26 presented the Val/Val genotype, 6 presented the Val/Met, and 1 presented the Met/Met. In the female group (n=20), Val/Val was seen in 14 subjects, Val/Met in 6 patients, and no Met/Met case. Since the Met/Met genotype at the BDNF was present in only one subject, Met/Met and Val/Met carrier groups were merged and classified into Met carriers, as done by other investigations.<sup>(14)</sup> The distributions of genotypes did not deviate from Hardy–Weinberg equilibrium ( $\chi^2=2.74$ ,  $p=0.26$ ).

Wisconsin Card Sorting Test scores presented asymmetrical distribution, and their values were normalized using log transformation. Data from WCST-T1C and WCST-%CLR from five patients was not available, and so they were excluded from the MANCOVA. The current use of medication was not associated to any WCST subtest scores (WCST-P  $p=0.32$ ; WCST-NP  $p=0.83$ ; WCST-CC  $p=0.31$ ; WCST-%CONC  $p=0.28$ ; WCST-1stCAT  $p=0.90$ ) and was not included in the MANCOVA model.

No significant difference was observed between the Val/Val and Val/Met+Met/Met groups and the WCST results in the MANCOVA ( $F_{48,5}=0.76$ ;  $p=0.59$ - Partial Eta Squared=0.08), or WCST specific categories (Perseverative Errors –  $p=0.66$  - Partial Eta Squared<0.01; Nonperseverative Errors –  $p=0.58$  - Partial Eta Squared<0.01; Categories Completed –  $p=0.34$  - Partial Eta Squared=0.02; Attempts to Reach First Category –  $p=0.64$  - Partial Eta Squared<0.01; and Percentage of Conceptual Level Responses –  $p=0.99$  - Partial Eta Squared<0.01). Results are presented in Table 2. Even though comorbidity with ADHD was not considered a confounder in our comprehensive approach, its inclusion in the model did not change significantly our findings ( $p=0.49$ ).

## Discussion

This was the first investigation to assess the role of a gene on neuropsychological tests in children and adolescents with Bipolar Disorder. We were not able to detect any differences in a test of the frontal lobe function (Wisconsin Card Sorting Test) and the Val66Met polymorphism at the BDNF gene.

Our findings differ from results in adult samples with Bipolar Disorder, where a worse performance in the Wisconsin Card Sorting Test was observed for BDNF Met allele carriers, even when comparing subjects with BD and those with schizophrenic and typical development.<sup>(14,15,16)</sup> In adults with schizophrenia, other groups also reported no association between the BDNF Val66Met polymorphism and performance in the WCST in a quantitative transmission disequilibrium test (QTDT) analyses,<sup>(30)</sup> and in a comparison of schizophrenic homicidal and non-homicidal male adults.<sup>(31)</sup> Since this is a pioneer study in children and adolescents, we cannot draw age-specific comparisons.

Although BDNF has been widely implicated in the neurobiology of adult BD, it is possible that its measurable effects on neuropsychological functions are not present in early age, due to ongoing development of prefrontal and frontal areas (and consequently executive functions) through adolescence, as has been suggested by other neuropsychological studies of JBD.<sup>(32,33)</sup> This speculation is partially supported by findings in our sample, since subjects presented a positive correlation between age and performance in all WCST categories.

There are robust data suggesting that children and adolescents with BD present deficits in executive functions, such as abstract thinking, problem-solving skills, and cognitive flexibility, which can result in maladaptive behavior.<sup>(33)</sup> We cannot rule out that WCST was not able to detect these deficits, since executive functions weaknesses in JBD are milder and less consistent than in other childhood disorders like ADHD.<sup>(34)</sup> Also, some patients were using mood

stabilizers and antipsychotics, and we cannot specify their effect on test results. However, current findings in Juvenile Bipolar Disorder are that neuropsychological persist regardless of illness state or medication status, although findings are limited and inconclusive.<sup>(35)</sup> Futures studies may address these issues through the use of different neuropsychological tests and on drug-naïve subjects.

Our findings should be interpreted considering some limitations: the met allele frequency in our sample was lower than in the other previous studies, and so was the frequency of females in our sample. However, no change resulted from the inclusion of gender in the model. Although our sample size was comparable with the original study in adults (n=54), we can not completely exclude that lack of power affected our results. Our effect size estimates for all WCST scores (eta partial squares) were extremely small suggesting no relevant effects of this polymorphism in the WCST scores. In addition, in order to reach 80% power in all WCST subtests, with the means and standard deviations found in our sample, the minimum sample size we would need for statistical significance would be 1113 subjects in WCST-PE, 31005 subjects in WCST-NP, 3339 in WCST-CC, 1680 in WCST-1stCAT, and 100800 in WCST-%CLR. These extremely elevated numbers strengthen the nonsignificance of the difference between the genotypes. Statistic control for sociodemographic and clinic potential confounders was wide and strongly suggests our findings are not influenced by other variables.

Further investigations with larger samples and including a more comprehensive battery may provide a better understanding of neurobiological pathways involved in this highly disabling disorder.

### **Acknowledgements**

The authors would like to thank the FIPE = Fundo de Incentivo à Pesquisa e Ensino of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre for funding.

## References

1. Biederman J, Faraone SV, Wozniak J, Mick E, Kwon A, Aleardi M. Further evidence of unique developmental phenotypic correlates of pediatric bipolar disorder: findings from a large sample of clinically referred preadolescent children assessed over the last 7 years. *J Affect Disord.* 2004;82(1):45-58.
2. Tramontina S, Zeni CP, Ketzer CR, Pheula GF, Narvaez J, Rohde LA. Aripiprazole in children and adolescents with bipolar disorder comorbid with attention-deficit/hyperactivity disorder: a pilot randomized clinical trial. *J Clin Psychiatry.* 2009;70(5):756-64.
3. McClellan J, Kowatch R, Findling RL. Practice parameter for the assessment and treatment of children and adolescents with bipolar disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2007;46(1):107-25. Erratum in: *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2007;46(6):786.
4. Carlson GA, Bromet EJ, Driessens C, Mojtabai R, Schwartz JE. Age at onset, childhood psychopathology, and 2-year outcome in psychotic bipolar disorder. *Am J Psychiatry* 2002;159:307-9.
5. Findling RL, Gracious BL, McNamara NK, Youngstrom EA, Demeter CA, Calabrese JR. Rapid, continuous cycling and psychiatric co-morbidity in pediatric bipolar I disorder. *Bipolar Disord.* 2001;3:202-10.
6. Geller B, Bolhofner K, Craney J, Williams M, DelBello M, Gundersen K. Psychosocial functioning in a prepubertal and early adolescent bipolar disorder phenotype. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2000;39:1543-8.
7. Zeni CP, Tramontina S, Ketzer CR, Pheula GF, Rohde LA. Methylphenidate combined with aripiprazole in children and adolescents with bipolar disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder: a randomized crossover trial. *J Child Adolesc Psychopharmacol.* 2009;19(5):553-61.
8. Geller B, Tillman R, Craney J, Bolhofner K. Four-year prospective outcome and natural history of mania in children with a prepubertal and early adolescent bipolar disorder phenotype. *Arch Gen Psychiatry.* 2004;61:459-67.
9. Doyle AE, Wilens TE, Kwon A, Seidman LJ, Faraone SV, Fried R, Swezey A, Snyder L, Biederman J. Neuropsychological functioning in youth with bipolar disorder. *Biol Psychiatry.* 2005;58(7):540-8.
10. Bearden CE, Hoffman KM, Cannon TD. The neuropsychology and neuroanatomy of bipolar affective disorder: A critical review. *Bipolar Disord.* 2001;3(3):106-50.
11. Lera-Miguel S, Andrés-Perpiñá S, Calvo R, Fatjó-Vilas M, Fañanás L, Lázaro L. Early-onset bipolar disorder: how about visual-spatial skills and executive functions? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2011;261(3):195-203. Erratum in: *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2011;261(3):229.

12. Hashimoto K, Shimizu E, Iyo M. Critical role for brain derived neurotrophic factor in mood disorders. *Brain Res Rev.* 2004;45:104-14
13. Geller B, Badner JA, Tillman R, Christian SL, Bolhofner K, Cook EH. Linkage disequilibrium of the brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism in children with a prepubertal and early adolescent bipolar disorder phenotype. *Am J Psychiatry.* 2004;161:1698-700
14. Rybakowski JK, Borkowska A, Czerski PM, Skibińska M, Hauser J. Polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene and performance on a cognitive prefrontal test in bipolar patients. *Bipolar Disord.* 2003;5(6):468-72.
15. Rybakowski JK, Borkowska A, Skibinska M, Hauser J. Illness-specific association of val66met BDNF polymorphism with performance on Wisconsin Card Sorting Test in bipolar mood disorder. *Mol Psychiatry.* 2006;11(2):122-4.
16. Rybakowski JK, Borkowska A, Skibinska M, Szczepankiewicz A, Kapelski P, Leszczynska-Rodziewicz A, Czerski PM, Hauser J. Prefrontal cognition in schizophrenia and bipolar illness in relation to Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2006;60(1):70-6.
17. American Psychiatric Association: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th ed. Washington (DC): American Psychiatric Press, 1994.
18. Kaufman J, Birmaher B, Brent D, Rao U, Flynn C, Moreci P, Williamson D, Ryan N. Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children—Present and Lifetime Version (K-SADS-PL): initial reliability and validity data. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 1997;36:980-88.
19. Polanczyk GV, Eizirik M, Aranovich V, Denardin D, da Silva TL, da Conceição TV, Pianca TG, Rohde LA. Interrater agreement for the schedule for affective disorders and schizophrenia epidemiological version for school-age children (K-SADS-E). *Rev Bras Psiquiatr.* 2003;25:87-90.
20. Young RC, Biggs JT, Ziegler VE, Meyer DA. A rating scale for mania: reliability, validity and sensitivity. *Br J Psychiatry.* 1978;133:429-35.
21. Vilella JA, Crippa JA, Del-Ben CM, Loureiro SR. Reliability and validity of a Portuguese version of the Young Mania Rating Scale. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38:1429-39.
22. Poznanski EO, Grossman JA, Buchsbaum Y, Banegas M, Freeman L, Gibbons R. Preliminary studies of the reliability and validity of the children's depression rating scale. *J Am Acad Child Psychiatry.* 1984;23(2):191-7.
23. Barbosa GA, Dias MD, Gaião AA, Di Lorenzo WF. Escala para avaliação de depressão em crianças - revisada (CDRS-R): uma análise exploratória. *Rev Neuropsiquiatr Infanc Adolesc.* 1997;5(1):15-18.

24. Cunha AB, Frey BN, Andrezza AC, Goi JD, Rosa AR, Goncalves CA, Santin A, Kapczinski F. Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. *Neurosci Lett*. 2006;398(3):215-9.
25. Neves-Pereira M, Mundo E, Muglia P, King N, Macciardi F, Kennedy JL. The brain-derived neurotrophic factor gene confers susceptibility to bipolar disorder: evidence from a family-based association study. *Am J Hum Genet*. 2002;71(3):651-5.
26. Lahiri DK, Nurnberger JI Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(19):5444.
27. Strauss E, Sherman EMS, Spreen O. *A Compendium of Neuropsychological Tests: administration, norms and commentary*. 3rd ed. New York (NY): Oxford University Press; 2006.
28. Heaton RK, Chelune GJ, Talley JL, Kay GG, Curtis G. *Wisconsin Card Sorting Test Manual*. Odessa (FL): Psychological Assessment Resources; 1993.
29. Cunha JA, Trentini CM, Argimon IL, Oliveira MS, Werlang BG, Prieb RG. *Teste Wisconsin de classificação de cartas: manual*. São Paulo (SP): Casa do Psicólogo; 2005.
30. Rosa A, Cuesta MJ, Fatjó-Vilas M, Peralta V, Zarzuela A, Fañanás L. The Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene is associated with risk for psychosis: evidence from a family-based association study. *Am J Med Genet B europysiatr Genet*. 2006;141(2):135-8.
31. Chung S, Chung HY, Jung J, Chang JK, Hong JP. Association among aggressiveness, neurocognitive function, and the Val66Met polymorphism of brain-derived neurotrophic factor gene in male schizophrenic patients. *Compr Psychiatry*. 2010;51(4):367-72.
32. Rubia K, Smith AB, Woolley J, Nosarti C, Heyman I, Taylor E, Brammer M. Progressive increase of frontostriatal brain activation from childhood to adulthood during event-related tasks of cognitive control. *Hum Brain Mapp*. 2006;27(12):973-93.
33. Henin A, Mick E, Biederman J, Fried R, Wozniak J, Faraone SV, Harrington K, Davis S, Doyle AE. Can bipolar disorder-specific neuropsychological impairments in children be identified? *J Consult Clin Psychol*. 2007;75(2):210-20.
34. Willcutt EG, Sonuga-Barke EJS, Nigg JT, Sergeant JA. Recent Developments in Neuropsychological Models of Childhood Psychiatric Disorders. In: Banaschewski T, Rohde LA, editors. *Biological Child Psychiatry. Recent Trends and Developments*. Adv Biol Psychiatry. Basel, Karger, 2008, vol 24, pp 195-226.
35. Pavuluri MN, Schenkel LS, Aryal S, Harral EM, Hill SK, Herbener ES, Sweeney JA. Neurocognitive function in unmedicated manic and medicated euthymic pediatric bipolar patients. *Am J Psychiatry*. 2006;163(2):286-93.



## Tables

Table 1. Demographics and Clinical Characteristics of the Sample

		Val/Val (n=40)	Val/Met (n=12) or Met/Met (n=1)	
		Mean±Std.Deviation	Mean±Std.Deviation	p
Age		11.90±2.61	10.07±3.01	0.07
Duration of Disorder		5.03±2.87	5.25±2.54	0.84
Intelligence Quotient		86.27±14	90.25±16.2	0.45
Children's Global Assessment Scale		47.78±11.96	51.00±10.80	0.38
Young Mania Rating Scale		24.41±13.45	27.22±9.08	0.46
Children's Depression Rating Scale, Revised		41.84±14.52	39.55±14.8	0.68
		Frequency: n (%)	Frequency: n (%)	
Socio-economical status		C: 25 (62.5%)	C: 11 (84.6%)	0.37
Gender	Male	26 (65%)	7 (53.8%)	0.52
Ethnicity	Caucasian	34 (85%)	12 (92.3%)	0.6
Bipolar Disorder Subtype	Bipolar Disorder- Type I	26 (65%)	11 (84.6%)	0.41
	Bipolar Disorder- Type II	6 (15%)	1 (7.7%)	
	Bipolar Disorder-Not Otherwise Specified	8 (20%)	1 (7.7%)	
Comorbidities	Attention- Deficit/Hyperactivity Disorder	35 (87.5%)	10 (77%)	0.39
	Disruptive Disorders	25 (62.5%)	8 (61.5%)	0.5
	Anxiety Disorders	21 (52.5%)	5 (38.5%)	1.00
	Enuresis	7 (17.5%)	4 (30.8%)	0.43
Current Medication Use		10 (25%)	6 (46.1%)	0.18

Table 2. Comparison of the Val66Met polymorphism at the BDNF gene in the results of the Wisconsin Card Sorting Test in children and adolescents with Bipolar Disorder \*

Wisconsin Card Sorting Test	Val/Val (n=38)	Val/Met (n=9) or Met/Met (n=1)	p	Partial EtaSquared
	Mean±Std. Deviation			
Percentage of Perseverative Errors	20.39 ± 10.95	18.90 ± 10.64	0.66	<0.01
Percentage of Nonperseverative Errors	22.37 ± 12.24	24.50 ± 12.68	0.58	<0.01
Number of Correctly Completed Categories	3 ± 1.98	3.60 ± 2.01	0.34	0.02
Set to the First Category	34.07 ± 35.67	25.5 ± 18.22	0.64	<0.01
Percentage of Conceptual Level Responses	44.15 ± 20.36	44.61 ± 24.05	0.99	<0.01

\* Multivariate Analysis of Variance ( $F_{48,5}=0.76$ ;  $p=0.59$ - Partial Eta Squared=0.08).

## Legends

Table 1. Demographics and Clinical Characteristics of the Sample

Table 2. Comparison of the Val66Met polymorphism at the BDNF gene in the results of the Wisconsin Card Sorting Test in children and adolescents with Bipolar Disorder \*

\* Multivariate Analysis of Variance ( $F_{48,5}=0.76$ ;  $p=0.59$ - Partial Eta Squared=0.08).

**TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO:**

Nome:

Data de Nascimento:

Médico Supervisor: Cristian Zeni

Antes de participar deste estudo, gostaríamos que você tomasse conhecimento do que ele envolve. Damos abaixo alguns esclarecimentos sobre dúvidas que você possa ter. Em caso de qualquer outra dúvida quanto ao estudo e o que ele envolve e sobre os seus direitos, você deverá contatar o Dr. Cristian Zeni pelos telefones (051)3359-8094 ou (51) 3331-9216.

Muitas crianças têm problemas de humor ficando muitas vezes deprimidas e outras vezes irritadas, com explosões de humor. Podem apresentar também euforia, grandiosidade, diminuição da necessidade de sono, agitação, pensamento muito rápido mudando de um assunto para outro, aumento do interesse por assuntos ligados a sexo, entre outros. Este problema de saúde chama-se Transtorno de Humor Bipolar (THB).

Muitas crianças também têm problemas de atenção, ficam facilmente distraídas, inquietas, esquecem coisas que se propõem a fazer, movimentam-se constantemente e excessivamente em suas atividades, são impulsivas e se intrometem nos assuntos dos outros. Este problema de saúde mental chama-se Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH).

**Qual o objetivo desta pesquisa?**

Conhecer características clínicas dos pacientes e sua possível relação com alterações genéticas (um local do gene do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro, chamado val66met). Existe uma possibilidade de associação dessa alteração genética com o transtorno bipolar, mas mais estudos devem ser feitos para constatar tal afirmação. Além disso, pretendemos saber se a proteína codificada por este gene têm níveis mais baixos nas crianças e adolescentes com THB, TDAH do que em crianças sem estes problemas. Ou seja, este estudo tem por objetivo, de uma forma geral, conhecer um pouco melhor como “funciona” o transtorno bipolar.

**O que acontecerá neste estudo?**

Após as crianças e adolescentes e seus pais responderem às questões em estudo através de questionários, será feito um exame de sangue com a criança/adolescente e seus pais biológicos. Este exame será utilizado para observar uma alteração chamada polimorfismo em um local do gene chamado val66met, se os pais também têm esse polimorfismo, e para determinar os níveis da proteína codificada por este gene no sangue.

Poderá ser solicitado a você e a seu filho que a aplicação dos questionários seja filmada, para treinamento dos assistentes de pesquisa, e para avaliação da confiabilidade dos dados. Caso isto seja necessário, será realizado um convite pelo pesquisador, que você pode aceitar ou não, sem prejuízo para sua participação neste estudo.

**Quais os benefícios em participar deste estudo?**

A sua participação neste estudo poderá proporcionar, no âmbito pessoal, a identificação de algum problema não antes conhecido com posterior encaminhamento para atendimento, e no âmbito coletivo, poderá ajudar no desenvolvimento de maior conhecimento do transtorno bipolar principalmente em relação às causas da doença e como ela funciona.

**Quais são os direitos dos participantes?**

Os pesquisadores deste estudo podem precisar examinar os seus registros, a fim de verificar as informações para o objetivo deste estudo. No entanto, os seus registros médicos serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados deste estudo poderão ser enviados para publicação em um jornal científico, mas você não será identificado por nome. Sua participação no estudo é voluntária, de forma que caso você decida não participar, isto não afetará a sua avaliação e encaminhamento.

**Quais são os riscos que envolvem este estudo?**

Este estudo possui riscos mínimos que são inerentes do procedimento de coleta de sangue.

**Quais são as responsabilidades dos participantes?**

Os participantes deste estudo comprometem-se a comparecer às consultas marcadas, bem como responder fidedignamente as escalas aplicadas pelos médicos pesquisadores e as escalas auto-aplicáveis.

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Nome do responsável Legal do paciente: \_\_\_\_\_

Grau de parentesco com o paciente: \_\_\_\_\_

Médico Supervisor: \_\_\_\_\_

Assinatura do paciente: \_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_

Assinatura do familiar responsável pelo paciente: \_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_

Tenho pleno conhecimento e expresse minha anuência quanto à gravação em vídeo da minha participação, podendo ser a mesma utilizada pelos pesquisadores para fins de estudo e treinamento, não podendo haver divulgação deste material para outros fins sem consentimento adicional.

Assinatura do paciente: \_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_

Assinatura do familiar responsável pelo paciente: \_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_