



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Bases genètiques del trastorn per dèficit d'atenció amb hiperactivitat i de la resposta farmacològica al metilfenidat

Mireia Pagerols Teixidó

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Bases genètiques del trastorn per dèficit d'atenció amb hiperactivitat i de la resposta farmacològica al metilfenidat

Memòria presentada per

Mireia Pagerols Teixidó

per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona

Tesi doctoral realitzada a l'Institut de Recerca Vall d'Hebron sota la direcció de la Dra. Marta Ribasés Haro i el Dr. Josep Antoni Ramos Quiroga, i la tutoria del Dr. Bru Cormand Rifà.

**Dra. Marta
Ribasés Haro**

**Dr. Josep Antoni
Ramos Quiroga**

**Dr. Bru
Cormand Rifà**

**Mireia
Pagerols Teixidó**

Programa de Doctorat en Genètica

Departament de Genètica

Facultat de Biologia

Universitat de Barcelona

Barcelona, juliol de 2018

Barcelona, 2018

Disseny de portada: Cristina Tomàs

Impressió i enquadernació: Alfambra Copisteria

*Genes load the gun,
lifestyle pulls the trigger.*

Dr. Caldwell B. Esselstyn Jr.

ÍNDIX DE CONTINGUTS

ABREVIATURES.....	9
RESUM	11
ABSTRACT	13

Introducció..... 15

1. TRASTORN PER DÈFICIT D'ATENCIÓ AMB HIPERACTIVITAT	17
1.1. Característiques clíniques i epidemiologia	17
1.2. Etiologia.....	20
1.2.1. Factors genètics	21
1.2.2. Factors ambientals	33
1.3. Interacció gen × ambient	35
1.4. Tractament	36
1.4.1. Tractament no farmacològic.....	37
1.4.2. Tractament farmacològic.....	38
2. FARMACOGENÈTICA DEL MPH	40
2.1. Farmacodinàmica del MPH	41
2.2. Farmacocinètica del MPH	41
2.3. Tractament amb MPH i avaluació de la resposta terapèutica	43
2.4. Estudis farmacogenètics sobre l'eficàcia del MPH	46
2.4.1. Estudis d'associació basats en gens candidats.....	46
2.4.2. Estudis a escala genòmica	65
2.4.3. Estudis d'interaccions gen × gen i gen × ambient	66
2.5. Estudis farmacogenètics sobre la tolerabilitat al MPH	67
2.6. Limitacions	70

Objectius..... 71

1. HIPÒTESIS I OBJECTIUS	73
1.1. Hipòtesi 1.....	73
1.1.1. Objectius.....	74
1.2. Hipòtesi 2.....	74
1.2.1. Objectius.....	75
1.3. Hipòtesi 3.....	75
1.3.1. Objectius.....	76

Resultats77

1. INFORME DELS DIRECTORS SOBRE LA CONTRIBUCIÓ DE LA DOCTORAND A LES PUBLICACIONS DE LA PRESENT TESI DOCTORAL.....	79
1.1. Publicació 1.....	79
1.2. Publicació 2.....	79
1.3. Publicació 3.....	80
2. RESULTATS.....	81
2.1. Estudi 1. Implicació del gen <i>DRD4</i> i dels esdeveniments vitals estressants en la persistència del TDAH.....	81
2.1.1. Resum.....	81
2.1.2. Referència.....	81
2.2. Estudi 2. Farmacogenètica de la resposta i tolerabilitat al MPH en pacients infantils amb TDAH.....	94
2.2.1. Resum.....	94
2.2.2. Referència.....	94
2.3. Estudi 3. Anàlisi genòmica integradora de la resposta al MPH en pacients infantils amb TDAH.....	102
2.3.1. Resum.....	102
2.3.2. Referència.....	102

Discussió 115

1. PRINCIPALS RESULTATS I DISCUSSIÓ GENERAL.....	117
1.1. Bases genètiques del TDAH i de la resposta farmacològica al MPH.....	117
1.1.1. Implicació del sistema dopaminèrgic.....	117
1.1.2. Implicació de gens del neurodesenvolupament.....	120
1.2. Influència de l'ambient en la gravetat i farmacologia del TDAH.....	122
1.2.1. Esdeveniments vitals estressants.....	122
1.2.2. Exposició prenatal al tabac.....	126
1.3. Consideracions metodològiques.....	129
1.3.1. Mida de la mostra.....	129
1.3.2. Selecció de polimorfismes.....	130
1.3.3. Anàlisi d'interaccions gen \times ambient.....	130
1.3.4. Disseny experimental.....	132
1.4. Perspectives de futur.....	134

Conclusions	137
1. CONCLUSIONS FINALS.....	139
1.1. Conclusions.....	139
1.2. Conclusions (English).....	140
Bibliografia.....	141

ABREVIATURES

ADHD	<i>Attention-deficit/hyperactivity disorder</i>
ADN	Àcid desoxiribonucleic
ADRA2A	Receptor adrenèrgic α_{2A}
ARN	Àcid ribonucleic
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
CDH13	Cadherina 13
CDH23	Cadherina 23
CES1	Carboxilesterasa 1
CGI-I	<i>Clinical Global Impression-Improvement</i>
CGI-S	<i>Clinical Global Impression-Severity</i>
CHRNA4	Receptor nicotínic d'acetilcolina $\alpha 4$
CHRNA7	Receptor nicotínic d'acetilcolina $\alpha 7$
CNV	Variant en el número de còpies
COMT	Catecol-O-metiltransferasa
CTNNA2	Catenina $\alpha 2$
CYP2D6	Citocrom P450 2D6
DAT1	Transportador de dopamina
DBH	Dopamina β -hidroxilasa
DRD1-5	Receptor dopaminèrgic D1-5.
DSM	Manual diagnòstic i estadístic dels trastorns mentals (<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>)
eQTL	<i>Loci de trets quantitatus (expression quantitative trait loci)</i>
eSNP	Polimorfisme d'un únic nucleòtid que actua com a eQTL
G \times E	Interacció gen \times ambient (<i>gene-environment interaction</i>)
GWAS	Estudi d'associació a escala genòmica (<i>genome-wide association study</i>)
HPA	Eix hipotàlem-hipòfisi-adrenal (<i>hypothalamic-pituitary-adrenal axis</i>)
HTR1B	Receptor serotoninèrgic 1B
HTR2A	Receptor serotoninèrgic 2A
HTR2C	Receptor serotoninèrgic 2C
KALRN	Kalirina
LD	Desequilibri de lligament (<i>linkage disequilibrium</i>)
LPHN3	Latrofilina 3
MAOA	Monoamino oxidasa A
MPH	Metilfenidat (<i>methylphenidate</i>)
OPRM1	Receptor opioide μ

PATS	<i>Preschool ADHD Treatment Study</i>
PCA	Anàlisi de components principals (<i>principal component analysis</i>)
PCB	Bifenils policlorats (<i>polychlorinated biphenyls</i>)
PGC	Consortori de psiquiatria genòmica (<i>Psychiatric Genomics Consortium</i>)
SERS	<i>Stimulant Side Effects Rating Scale</i>
SLC6A2	Transportador de noradrenalina
SLC6A3	Transportador de dopamina
SLC6A4	Transportador de serotonina
SNAP25	<i>Synaptosome-associated protein 25</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors</i>
SNP	Polimorfisme d'un únic nucleòtid (<i>single-nucleotide polymorphism</i>)
TDAH	Trastorn per dèficit d'atenció amb hiperactivitat
TEA	Trastorns de l'espectre autista
TH	Tirosina hidroxilasa
TPH2	Triptòfan hidroxilasa 2
VNTR	Nombre variable de repeticions en tàndem (<i>variable number of tandem repeats</i>)

RESUM

El trastorn per dèficit d'atenció amb hiperactivitat (TDAH) és un trastorn del neurodesenvolupament caracteritzat per símptomes d'inatenció i/o hiperactivitat/impulsivitat. Nombrosos estudis suggereixen un important component genètic en l'etiologia del TDAH, amb una heretabilitat estimada del 70-80%. Tanmateix, la majoria de variants genètiques identificades només expliquen una petita proporció de la variabilitat fenotípica observada i la seva associació, en general, no ha estat replicada consistentment. A més, s'han descrit diversos factors ambientals que tendeixen a incrementar el risc de presentar TDAH i que sovint contribueixen a agreujar-ne les manifestacions. Les discrepàncies en els resultats obtinguts, per tant, podrien ser degudes, entre d'altres, a la influència de variables ambientals, capaces de modular els efectes dels factors genètics a través d'interaccions gen \times ambient.

Pel que fa a l'abordatge terapèutic del TDAH, el principal tractament farmacològic consisteix en l'administració de psicoestimulants com el metilfenidat (MPH), un potent inhibidor de la recaptació de dopamina. No obstant això, aproximadament un 30% dels pacients no respon adequadament al fàrmac, fet que podria estar determinat, en part, per influències genètiques. La recerca farmacogenètica del MPH s'ha centrat de forma quasi exclusiva en gens suposadament relacionats amb el seu mecanisme d'acció, entre els quals destaquen el transportador de dopamina (*SLC6A3*) i el receptor dopaminèrgic D4 (*DRD4*), malgrat que els resultats aportats han estat predominantment negatius o discordants. La majoria d'investigacions, a més, han avaluat un únic o un nombre molt reduït de polimorfismes en base a la seva presumpta rellevància funcional, sense tenir en compte la possible interacció entre ells o amb influències ambientals.

L'objectiu de la present tesi doctoral fou, per una banda, aprofundir en els processos etiològics implicats en el TDAH mitjançant un estudi d'associació amb vuit gens candidats (*DRD4*, *SLC6A3*, *COMT*, *ADRA2A*, *CES1*, *CYP2D6*, *LPHN3* i *OPRM1*) en què s'avaluaren dotze polimorfismes potencialment funcionals en una mostra de sis-cents quatre pacients adults i sis-cents onze individus control. A continuació, s'investigà la influència d'experiències estressants durant la infantesa en la gravetat del trastorn, així com la possible interacció entre l'adversitat ambiental i les variants genètiques de risc identificades. Els resultats de l'esmentat estudi revelaren la contribució de *DRD4* en la persistència del TDAH

a l'edat adulta i proporcionaren evidències preliminars sobre el seu paper com a mediador de l'efecte que els esdeveniments vitals adversos exerceixen en la gravetat de la simptomatologia.

Per altra banda, es proposà identificar marcadors genètics de la resposta i la tolerabilitat al MPH. Per a aquesta finalitat, s'empraren dues estratègies complementàries. En primer lloc, s'examinaren cinquanta-set polimorfismes distribuïts al llarg dels principals gens de la neurotransmissió dopaminèrgica (*DRD1-5*, *SLC6A3*, *TH*, *COMT* i *DBH*) en una mostra de cent set pacients pediàtrics amb TDAH. A més, s'explorà la influència de variables ambientals pre i perinatales en els efectes del tractament, així com la presència d'interaccions gen \times gen i gen \times ambient. Els resultats de la segona investigació suggeriren la implicació de *DRD3*, *DBH*, *TH* i l'exposició prenatal al tabac en l'eficàcia clínica del MPH. Concretament, s'observà un major risc de resistència al tractament en individus susceptibles genèticament i amb mares fumadores durant l'embaràs mentre que l'aparició d'efectes adversos s'associà a la variabilitat a *DBH* i *DRD2*. En segon lloc, s'analitzà l'associació amb la resposta al MPH a escala genòmica en cent setanta-tres infants amb el trastorn. Les dades obtingudes es combinaren amb evidències biològiques i bioinformàtiques, fet que posà de manifest la participació de gens relacionats amb el desenvolupament i funció del sistema nerviós, malalties neurològiques i psiquiàtriques, com el dèficit d'aprenentatge, o la conducta, com el comportament hiperactiu.

En definitiva, els resultats que conformen la present tesi doctoral aporten informació innovadora i rellevant al camp de l'etiologia i la farmacogenètica del TDAH a través de la identificació de *loci* genètics implicats en el sistema dopaminèrgic i el neurodesenvolupament, i de factors ambientals com els esdeveniments vitals estressants o el consum matern de tabac durant l'embaràs.

ABSTRACT

Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is a neurodevelopmental disorder characterized by inattention and/or hyperactivity/impulsivity symptoms. Multiple evidence suggests a strong genetic component in the etiology of ADHD, with heritability estimates of 70-80%. However, most of the identified genetic variants explain only a small proportion of the phenotypic variance and their association has not been consistently replicated. Additionally, several environmental factors have been reported to increase the risk and severity of ADHD. Thus, the absence of clear conclusions might be caused, among other factors, by environmental influences that moderate the effects of genetic factors through gene-environment interactions.

Among the wide variety of pharmacological options available in ADHD treatment, stimulant medications such as methylphenidate (MPH), a dopamine reuptake inhibitor, are generally the first-line choice. Nevertheless, approximately 30% of ADHD patients do not respond favorably to treatment, which may reflect underlying genetic influences. Pharmacogenetic studies of MPH have focused on genes presumably related to its mechanism of action, especially the dopamine transporter (*SLC6A3*) and the dopamine receptor D4 (*DRD4*), although findings have been predominantly negative or inconsistent. Furthermore, the majority of investigations have evaluated a single or few polymorphisms based on their putative functional implications, without considering the possible interaction between them or with environmental factors.

The objective of the present doctoral thesis was to elucidate the etiological processes implicated in ADHD through an association study with eight candidate genes (*DRD4*, *SLC6A3*, *COMT*, *ADRA2A*, *CES1*, *CYP2D6*, *LPHN3* and *OPRM1*), which examined 12 potentially functional polymorphisms in a sample of 604 adult patients and 611 controls. We subsequently investigated the impact of childhood stressful experiences on the severity of ADHD, as well as the possible interaction between environmental adversity and the identified genetic risk variants. The results obtained revealed the contribution of *DRD4* to adult ADHD and provided preliminary evidence for its role in mediating the effects of adverse life events on ADHD symptoms.

On the other hand, the doctoral thesis aimed to identify pharmacogenetic markers of MPH response and tolerability. For that purpose, we performed two complementary strategies.

Firstly, we analyzed 57 polymorphisms across the main genes of the dopaminergic neurotransmission (*DRD1-5*, *SLC6A3*, *TH*, *COMT* and *DBH*) in a sample of 107 ADHD pediatric patients. We also explored the influence of prenatal and perinatal risk factors on treatment effects, as well as the presence of gene-gene and gene-environment interactions. Our findings suggested the involvement of *DRD3*, *DBH*, *TH* and prenatal smoking in the clinical efficacy of MPH. In particular, we observed a higher risk for treatment failure in genetically susceptible subjects whose mother smoked during pregnancy, while the emergence of adverse events was associated with variation in *DBH* and *DRD2*. Secondly, we conducted a genome-wide association study of MPH response in 173 children with ADHD. The data obtained were combined with bioinformatic and biological evidence, which highlighted genes related to nervous system development and function, neurological diseases, psychiatric disorders and behavior, including learning deficit and hyperactive behavior.

In conclusion, the results of the present doctoral thesis provide innovative and relevant information to the field of ADHD etiology and pharmacogenetics through the identification of genetic loci implicated in the dopaminergic system and neurodevelopment, and environmental factors such as stressful life events or maternal smoking during pregnancy.

Introducció

1. Trastorn per dèficit d'atenció amb hiperactivitat

- 1.1. Característiques clíniques i epidemiologia
- 1.2. Etiologia
- 1.3. Interacció gen \times ambient
- 1.4. Tractament

2. Farmacogenètica del MPH

- 2.1. Farmacodinàmica del MPH
- 2.2. Farmacocinètica del MPH
- 2.3. Tractament amb MPH i avaluació de la resposta terapèutica
- 2.4. Estudis farmacogenètics sobre l'eficàcia del MPH
- 2.5. Estudis farmacogenètics sobre la tolerabilitat al MPH
- 2.6. Limitacions

1. TRASTORN PER DÈFICIT D'ATENCIÓ AMB HIPERACTIVITAT

1.1. Característiques clíniques i epidemiologia

El trastorn per dèficit d'atenció amb hiperactivitat (TDAH) és un trastorn del neurodesenvolupament que es caracteritza per la presència de dificultats en el manteniment de l'atenció, la regulació dels nivells d'activitat motora i el control dels impulsos. En funció del símptomes amb què es manifesta predominantment el trastorn, el manual diagnòstic i estadístic dels trastorns mentals estableix, en la seva quarta edició revisada (DSM-IV-TR, de l'anglès *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition – Text Revision*) (APA, 2000), tres subtipus clínics de TDAH: el subtipus predominantment inatent quan es compleixen, com a mínim, sis dels nou criteris de dèficit d'atenció, el predominantment hiperactiu/impulsiu per al qual són necessaris almenys sis dels nou criteris d'hiperactivitat/impulsivitat, i el combinat en què es donen conjuntament sis o més criteris d'inatenció i hiperactivitat/impulsivitat. D'acord amb el DSM-IV-TR es requereix, a més, que els símptomes apareguin abans dels set anys en dos o més àmbits de la vida, es mantinguin durant almenys sis mesos, causin un deteriorament clínicament significatiu en el pacient i no siguin atribuïbles a altres trastorns mentals o del desenvolupament (Taula 1).

Nombrosos estudis prospectius han demostrat la persistència del trastorn, ja sigui de forma completa o en remissió parcial, en una proporció significativa dels adults diagnosticats durant la infantesa, malgrat que les manifestacions clíniques varien al llarg de la vida i els problemes d'inatenció, organització i planificació tendeixen a prevaldre amb l'edat per sobre dels d'hiperactivitat i impulsivitat (Faraone, Biederman i Mick, 2006; Haavik, Halmøy, Lundervold i Fasmer, 2010; Volkow i Swanson, 2013). Aquest fet, que dificulta la detecció del TDAH adult, ha estat parcialment redreçat en la darrera versió del DSM, el DSM-5 (APA, 2013), en la qual s'ha ampliat el límit en l'edat d'inici del trastorn fins als dotze anys, s'han introduït exemples adaptats al cicle vital per facilitar l'aplicació dels criteris diagnòstics i s'ha reduït el nombre de símptomes exigits (de sis a cinc) en cadascun dels dominis per als individus amb disset anys o més. A més, el terme 'subtipus' ha estat substituït per 'presentació actual' amb l'objectiu de reflectir la naturalesa canviant de les manifestacions clíniques al llarg del desenvolupament i es permet la presència conjunta del TDAH i trastorns de l'espectre autista (TEA).

Per altra banda, es calcula que aproximadament dos terços de la població infantil amb TDAH presenta simultàniament un o més trastorns psiquiàtrics (Elia, Ambrosini i Berrettini, 2008; Klassen, Miller i Fine, 2004; Larson, Russ, Kahn i Halfon, 2011), entre els quals destaquen el trastorn negativista desafiament, el trastorn de conducta, trastorns d'ansietat i de l'estat d'ànim, trastorns de l'aprenentatge i del llenguatge, trastorns del son, tics i trastorns del neurodesenvolupament com els TEA o la síndrome de Tourette (Jensen i Steinhausen, 2015; Larson et al., 2011; Spencer, 2006). La comorbiditat en l'adult és lleugerament superior, amb prevalences que oscil·len entre el 65-89% (Sobanski, 2006), i inclou, principalment, trastorns per ús de substàncies, trastorns d'ansietat i de l'estat d'ànim, trastorns del son i trastorns de la personalitat com el trastorn antisocial de la personalitat o el trastorn límit de personalitat (Haavik et al., 2010; Kooij et al., 2012; Sobanski, 2006).

El diagnòstic de TDAH, a més, s'associa durant l'etapa infantil i l'adolescència a un menor rendiment escolar, conflictes familiars, rebuig per part dels companys, baixa autoestima, comportaments disruptius, actes delictius i consum de substàncies com el tabac o l'alcohol (McGough, 2005; NIH, 2000; Warikoo i Faraone, 2013). Posteriorment, en l'adulthood, la presència del trastorn pot generar problemes d'adaptació al món laboral, desocupació, dificultats econòmiques, relacions interpersonals insatisfactòries, inestabilitat emocional, obesitat, propensió als accidents i una major incidència d'infraccions de trànsit i altres il·legalitats (Kessler et al., 2006; Klein et al., 2012; McGough, 2005) (Figura 1).

En conseqüència, el TDAH repercuteix significativament en el funcionament psicològic, emocional, acadèmic/laboral i social de les persones que el pateixen i, donada la seva elevada prevalença, constitueix un seriós problema de salut pública. Concretament, es tracta d'un dels trastorns psiquiàtrics més freqüents a la infantesa i s'estima que afecta entorn del 5,3-7,1% dels nens i adolescents a nivell mundial (Polanczyk, de Lima, Horta, Biederman i Rohde, 2007; Willcutt, 2012). Durant aquesta etapa, el TDAH es caracteritza per distribuir-se de forma desigual entre nens i nenes, amb una proporció de 2-4 a 1 (Catalá-López et al., 2012), probablement com a resultat de biaixos en la consulta i el diagnòstic del trastorn en les nenes, on es manifesta majoritàriament amb símptomes d'inatenció a diferència dels nens en què predominen els comportaments disruptius i hiperactius/impulsius (Biederman i Faraone, 2004; Davies, 2014). En adults, en canvi, la distribució entre sexes tendeix a igualar-se i la prevalença oscil·la entre un 2,5-4,4% (Davies, 2014; Fayyad et al., 2007; Kessler et al., 2006; Simon, Czobor, Bálint, Mészáros i Bitter, 2009).

Taula 1. Criteris diagnòstics per al TDAH segons el DSM-IV-TR

A. Es compleix 1 i/o 2:

1. Sis (o més) dels següents símptomes d'inatenció han persistit durant almenys sis mesos amb una intensitat que resulta desadaptativa i incoherent en relació al nivell de desenvolupament:

Inatenció

1. Sovint no para atenció suficient als detalls o comet errors per descuit en les tasques escolars, la feina o altres activitats.
 2. Sovint té dificultats per mantenir l'atenció en tasques o activitats lúdiques.
 3. Sovint sembla no escoltar quan se li parla directament.
 4. Sovint no segueix les instruccions i no finalitza les tasques escolars, encàrrecs o obligacions en el lloc de treball (no es deu a comportament oposicionista o a incapacitat per comprendre les instruccions).
 5. Sovint té dificultats per organitzar tasques i activitats.
 6. Sovint evita, li desagrada o és reticent a dedicar-se a tasques que requereixen un esforç mental sostingut (com ara treballs escolars o domèstics).
 7. Sovint extravia objectes necessaris per a tasques o activitats (p. e., joguines, exercicis escolars, llapis, llibres o eines).
 8. Sovint es distreu fàcilment per estímuls irrelevantes.
 9. Sovint és descuidat en les activitats diàries.
2. Sis (o més) dels següents símptomes d'hiperactivitat/impulsivitat han persistit durant almenys sis mesos amb una intensitat que resulta desadaptativa i incoherent en relació al nivell de desenvolupament:

Hiperactivitat

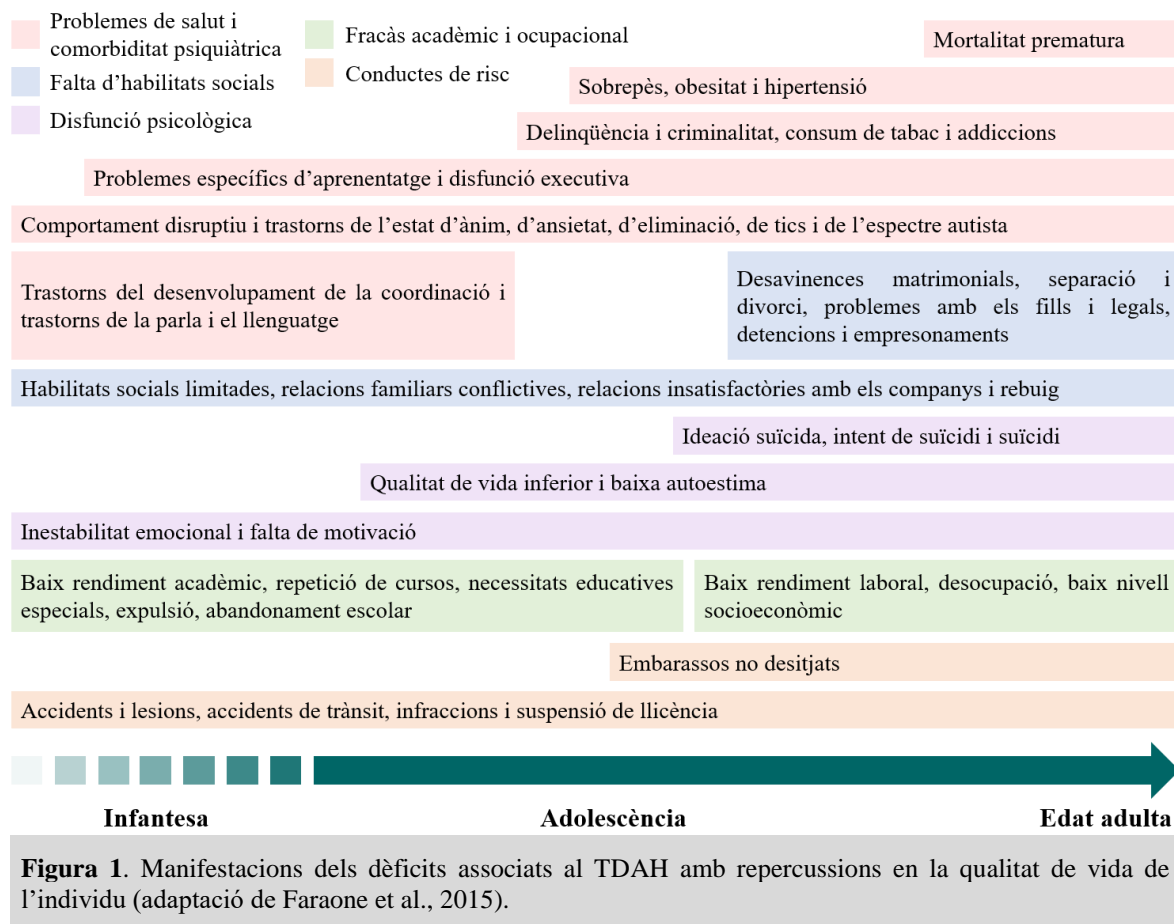
1. Sovint mou en excés mans o peus, o es belluga en el seu seient.
2. Sovint abandona el seu seient a classe o en altres situacions en què s'espera que resti assegut.
3. Sovint corre o salta excessivament en situacions en què resulta inapropiat (en adolescents o adults pot limitar-se a sentiments subjectius d'inquietud).
4. Sovint té dificultats per jugar o dedicar-se tranquil·lament a activitats d'oci.
5. Sovint "està en marxa" o sol actuar com si tingués un motor.
6. Sovint parla en excés.

Impulsivitat

7. Sovint precipita respostes abans d'haver-se completat les preguntes.
8. Sovint té dificultats per respectar el torn.
9. Sovint interromp o s'immisceix en les activitats dels altres (p. e., s'entremet en converses o jocs).

- B.** Alguns símptomes d'hiperactivitat/impulsivitat o inatenció que causen alteracions estaven presents abans dels set anys.
 - C.** Algunes alteracions provocades pels símptomes es presenten en dos o més ambients (p. e., a l'escola [o a la feina] i a casa).
 - D.** Han d'existir proves clares de deteriorament clínicament significatiu de l'activitat social, acadèmica o laboral.
 - E.** Els símptomes no apareixen exclusivament en el transcurs d'un trastorn generalitzat del desenvolupament, esquizofrènia o un altre trastorn psicòtic, i no s'expliquen millor per la presència d'un altre trastorn mental (p. e., trastorn de l'estat d'ànim, trastorn d'ansietat, trastorn dissociatiu o trastorn de la personalitat).
-

Nota de codificació. El terme 'remissió parcial' s'aplica a subjectes (en especial adolescents i adults) amb persistència dels símptomes i dèficits funcionals malgrat no acomplir la totalitat dels criteris diagnòstics.



1.2. Etiologia

El TDAH és un trastorn complex i heterogeni, l'etiologia del qual no es coneix amb exactitud. No obstant això, existeixen múltiples evidències que demostren la importància dels factors genètics en l'aparició de la malaltia. En primer lloc, els estudis realitzats en famílies revelen una major prevalença del trastorn entre els familiars de primer grau de nens amb TDAH que entre els familiars d'individus control (Biederman et al., 1992; Biederman, Faraone, Keenan, Knee i Tsuang, 1990; Faraone et al., 2000), així com un risc superior per a la descendència dels pacients adults (Biederman et al., 1995). En segon, diferents investigacions han avaluat la concordança del trastorn en bessons monozigòtics i dizigòtics i han permès estimar una heretabilitat al voltant del 70-80%, tant en infants com en adults (Asherson i Gurling, 2012; Biederman i Faraone, 2005; Faraone et al., 2005; Franke et al., 2012; Larsson, Chang, D'Onofrio i Lichtenstein, 2014). Finalment, mitjançant estudis d'adopció s'ha observat que la freqüència de TDAH és superior entre els familiars biològics d'individus amb el trastorn que entre els familiars adoptius (Figura 2) (Cantwell, 1975; Morrison i Stewart, 1973; Sprich, Biederman, Crawford, Mundy i Faraone, 2000). Per altra

banda, i malgrat aquest destacable component genètic en l'etiologia del trastorn, les dades aportades fins al moment suggereixen que aproximadament el 20-30% de la variabilitat fenotípica observada podria atribuir-se a factors ambientals no compartits com ara l'exposició prenatal al tabac, la prematuritat o el baix pes en néixer (Banerjee, Middleton i Faraone, 2007; Coghill i Banaschewski, 2009).

Així doncs, es considera que el TDAH és un trastorn multifactorial que resulta de la interacció entre una predisposició genètica a desenvolupar la malaltia i l'exposició a determinades circumstàncies que n'afavoreixen l'expressió (Banerjee et al., 2007; Faraone et al., 2015; Singh, Yeh, Verma i Das, 2015).

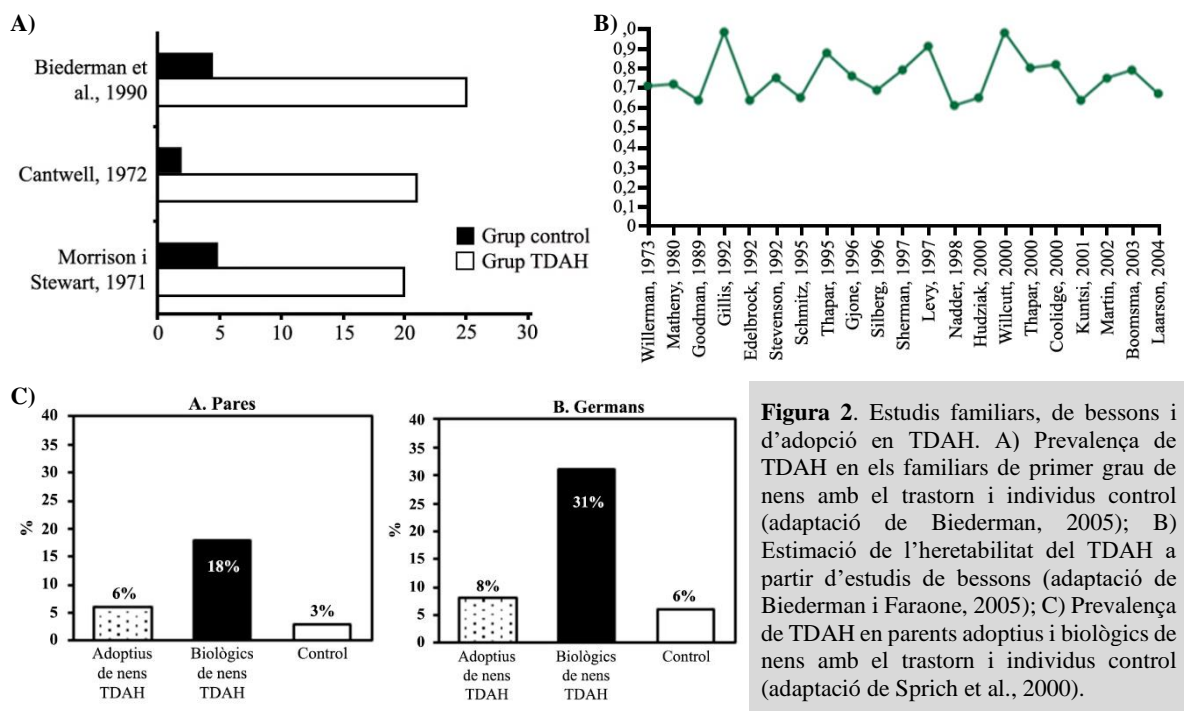


Figura 2. Estudis familiars, de bessons i d'adopció en TDAH. A) Prevalença de TDAH en els familiars de primer grau de nens amb el trastorn i individus control (adaptació de Biederman, 2005); B) Estimació de l'heretabilitat del TDAH a partir d'estudis de bessons (adaptació de Biederman i Faraone, 2005); C) Prevalença de TDAH en parents adoptius i biològics de nens amb el trastorn i individus control (adaptació de Sprich et al., 2000).

1.2.1. Factors genètics

Les evidències anteriorment descrites sobre la implicació dels factors genètics en l'etiologia del TDAH han estimulat la recerca i caracterització de les bases moleculars del trastorn a través de diferents metodologies en funció de la freqüència de les variants genètiques investigades a la població general i del seu efecte (Figura 3) (Manolio et al., 2009). En aquest sentit, els estudis de genètica molecular s'han fonamentat, al llarg de les dues últimes dècades, en la hipòtesi coneguda com a 'malaltia comuna, variant comuna', segons la qual les malalties comunes, com els trastorns complexos, són degudes a la contribució de múltiples variants al·lèliques amb freqüències superiors a 1-5% a la població.

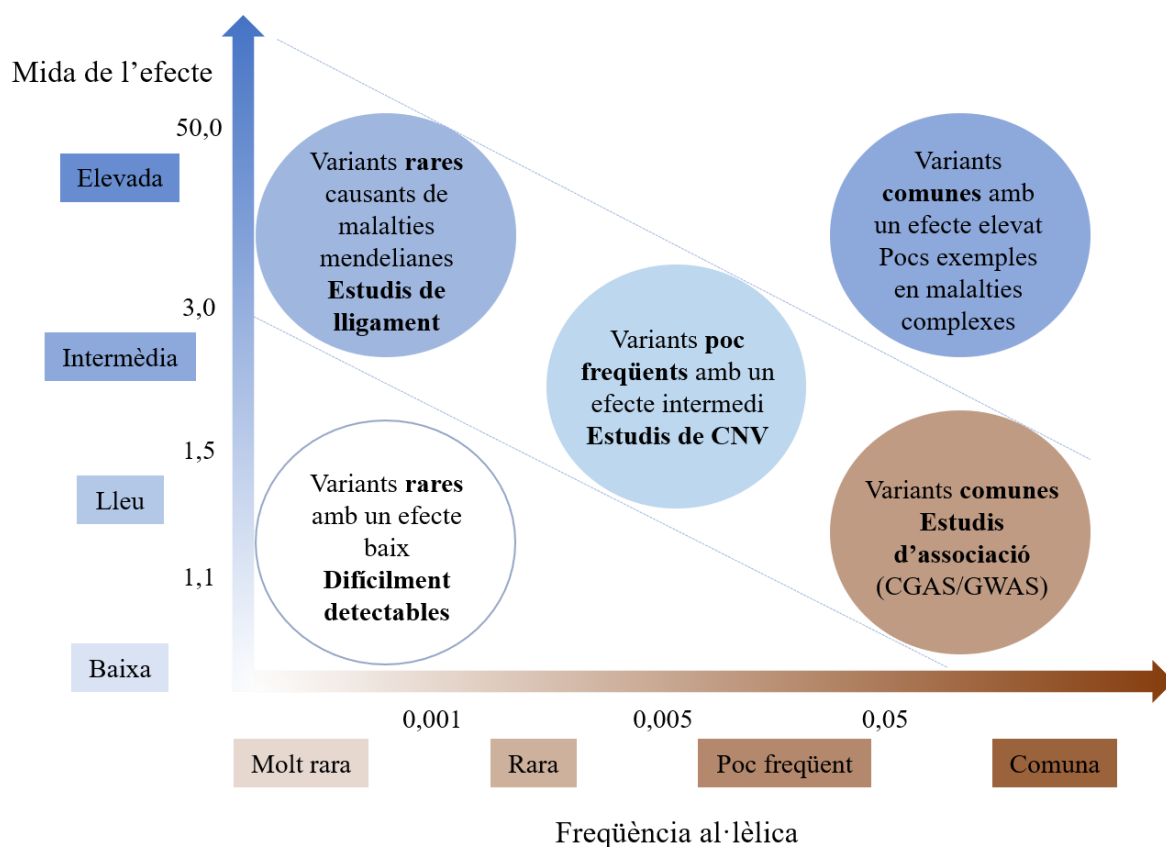
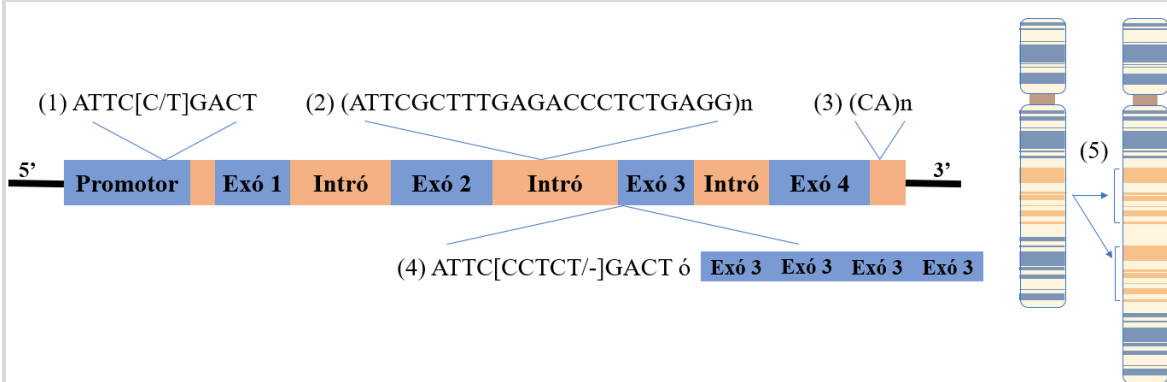


Figura 3. Viabilitat dels estudis moleculars en la identificació de variants genètiques segons la mida del seu efecte (*odds ratio*) i la freqüència al·lèlica a la població general (adaptació de Manolio et al., 2009).
Nota: CNV, variants en el número de còpies; CGAS, estudis d'associació de gens candidats; GWAS, estudis d'associació a escala genòmica.

No obstant això, la majoria de variants identificades fins ara exerceixen un efecte modest i únicament expliquen una petita proporció de l'heretabilitat del trastorn a què s'associen (Hawi et al., 2015; Manolio et al., 2009). En el cas del TDAH, per exemple, s'ha estimat que l'heretabilitat explicada per variants comunes com els polimorfismes d'un únic nucleòtid (SNP, de l'anglès *single-nucleotide polymorphism*) és del 28% (Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium et al., 2013). Alternativament, la hipòtesi de la 'malaltia comuna, variant rara' postula que les principals responsables de les malalties comunes són variants genètiques molt poc freqüents a la població però amb un notable efecte (Hawi et al., 2015).

Al Quadre 1 apareixen representades les diferents classes de variants genètiques més freqüentment estudiades, on a més dels SNP, que conformen el 90% de la variabilitat genètica del genoma humà, destaquen el nombre variable de repeticions en tàndem (VNTR, de l'anglès *variable number of tandem repeats*) i les variants en el número de còpies (CNV, de l'anglès *copy number variants*).

Quadre 1. Tipus de variants genètiques més freqüentment estudiades

- (1) Polimorfisme d'un únic nucleòtid (SNP), caracteritzat pel canvi d'una base per una altra.
- (2) Nombre variable de repeticions en tàndem (VNTR), caracteritzat per la repetició, de cinc a cinquanta vegades, d'una seqüència que oscil·la entre els deu i els seixanta-cinc nucleòtids.
- (3) Microsatèl·lit o repetició curta en tàndem (STR, de l'anglès *short tandem repeat*), caracteritzada per la repetició, de cinc a cinquanta vegades, d'una unitat que oscil·la entre dos i nou parells de bases (pb).
- (4) Variacions estructurals petites o mitjanes com les insercions/deleccions o les variants en el número de còpies (CNV).
- (5) Variacions estructurals grans com duplicacions, insercions, deleccions, inversions o translocacions.

1.2.1.1. Estudis de lligament genètic

Els estudis de lligament genètic permeten identificar regions cromosòmiques que contenen gens de susceptibilitat a una malaltia determinada, basant-se en la tendència amb què els *loci* genètics propers en el genoma es transmeten de forma conjunta com a resultat d'una menor freqüència de recombinació durant la meiosi. Aquest tipus d'anàlisis representaven sovint el primer pas en la investigació de les bases genètiques d'un trastorn, atès que no requereixen una hipòtesi biològica prèvia, i han resultat ser especialment efectives en la identificació de gens implicats en malalties mendelianes (Albayrak, Friedel, Schimmelmann, Hinney i Hebebrand, 2008; Dawn Teare i Barrett, 2005). Per contra, els resultats obtinguts en malalties amb una elevada heterogeneïtat genètica o en què l'efecte dels gens és relativament petit, com és el cas de les malalties complexes, han estat menys prometedors (Asherson i Gurling, 2012; Dawn Teare i Barrett, 2005; Li, Chang, Zhang, Gao i Wang, 2014).

Des de l'any 2002, s'han dut a terme quinze estudis de lligament genètic en TDAH; dotze d'ells a escala genòmica, dos basats en regions candidates prèviament reportades i un centrat específicament en el *locus* que conté el gen de la latrofilina 3 (*LPHN3*) (Taula 2). Mitjançant aquesta estratègia, s'han identificat més de cent regions diferents potencialment implicades en l'etiologia del trastorn, de les quals vint-i-dues han mostrat associacions significatives en anàlisis a escala genòmica i dues, la 6q12 i la 4q13.1, en estudis de regions candidates. No

obstant això, la majoria de *loci* no han estat replicats en estudis posteriors, amb l'excepció de les regions 16p13 (Ogdie et al., 2003; Smalley et al., 2002) i 17p11 (Arcos-Burgos et al., 2004; Ogdie et al., 2004) que s'han trobat significativament lligades al TDAH en dues ocasions. Davant d'aquesta manca de consistència i amb l'objectiu d'incrementar el poder estadístic, s'han realitzat dues meta-anàlisis que combinen els resultats obtinguts en diversos estudis de lligament a escala genòmica. La primera ha permès detectar una associació significativa amb la regió cromosòmica 5p13 (Ogdie et al., 2006) i la segona amb la regió 16q23.1 (Zhou et al., 2008) (Taula 2).

1.2.1.2. Estudis d'associació

Els estudis d'associació són actualment l'estratègia més utilitzada en l'abordatge genètic del TDAH i consisteixen en comparar les freqüències al·lèliques o genotípiques de determinats marcadors entre un grup d'individus afectats pel trastorn i un grup de controls sans. En funció del grup control emprat per a l'anàlisi, aquest tipus d'estudis es classifiquen en estudis d'associació cas-control poblacionals i estudis d'associació cas-control familiars.

Estudis d'associació cas-control poblacionals

Constitueixen l'aproximació majoritària en l'estudi dels trastorns complexos i utilitzen com a control individus no relacionats entre ells ni amb els pacients. El principal inconvenient d'aquest tipus d'estudis és la detecció de falsos positius com a conseqüència de la presència d'estratificació poblacional (Evangelou, Trikalinos, Salanti i Ioannidis, 2006). Per aquesta raó, és fonamental que la mostra de controls es trobi aparellada per edat, sexe i ètnia amb el grup de casos i únicament difereixin en la variable que es pretén avaluar.

Estudis d'associació cas-control familiars

Representen una alternativa per evitar l'estratificació poblacional ja que utilitzen la informació genètica dels progenitors (trio cas-progenitors) o germans (parella cas-germà) dels pacients com a control intern, de manera que existeix una base genètica compartida entre els diferents membres, a més d'una tendència a l'homogeneïtat pel que fa a l'exposició a factors ambientals. No obstant això, resulta difícil obtenir mostres suficientment grans de famílies ben caracteritzades, motiu pel qual l'aplicació d'aquesta estratègia és menys freqüent (Evangelou et al., 2006).

Taula 2. Estudis de lligament genètic en TDAH (incloses les meta-anàlisis)

Nº Estudi	Mètode	Disseny	Ètnia	Mida de la mostra	Regions reportades (gens candidats per al TDAH) ^a
1 Fisher et al., 2002	EG	Parelles de germans	Caucàsica	126 parelles de germans afectats de 104 famílies	2q14, 2q24, 3q24, 4p15, 5p12, 7p15, 8p23, 9q21, 9q22, 10q26, 11q25, 12p13, 12q23, 12q24, 13q12, 13q31, 13q33, 16p13, 16q21, 21q21, Xp22
2 Smalley et al., 2002	RC	Parelles de germans	Caucàsica	277 parelles de germans afectats de 203 famílies	16p13
3 Bakker et al., 2003	EG	Parelles de germans	Caucàsica	164 parelles de germans afectats de 106 famílies	3q13.32, 4p16.3, 5p13.1, 6q26, 7p13, 9p33.3, 10cen, 13q33.3, 15q15.1s
4 Ogdie et al., 2003	EG	Parelles de germans	Caucàsica	270 parelles de germans afectats de 204 famílies	5p13, 6p12, 6q14, 11q13, 11q25, 15q26, 16p13 (GRIN2A, EMP2, ZNF75A) , 17p11, 17p12, 20q13
5 Arcos-Burgos et al., 2004	EG	Llimatege	Païsa	16 famílies multi-generacionals	4q13.2, 5q33.3 (ADRA1B) , 8q11.23, 11q22 (MMP7, CNTN5) , 17p11 (MAP2K3)
6 Ogdie et al., 2004	RC	Parelles de germans	Caucàsica	308 parelles de germans afectats de 226 famílies	6q12, 17p11, 5p13
7 Hebebrand et al., 2006	EG	Parelles de germans	Caucàsica	155 parelles de germans	5p (FGF10, SLC6A3, SLC1A3, GDNF, HCN1, TRIO) , 6q, 7p, 8, 9q, 11q, 12q, 17p
8 Asherson et al., 2008	EG	Parelles de germans	Caucàsica	276 germans afectats	Chr2:181.5cM, Chr2:34.5cM, 9q22, Chr11:69cM, Chr14:100cM, 16q12, 16q23, Chr21:61.4cM, ChrX:141.9cM
9 Faraone et al., 2008	EG	Parelles de germans	Caucàsica	271 famílies amb 1.170 individus	Chr8:54.2cM, Chr8:93.4cM, Chr15:51.7cM
10 Romanos et al., 2008	EG	Llimatege	Caucàsica	8 famílies amb 191 individus	1q25.1, 1q25.3, 2q35, 5q13.1, 6q22-23 (IL20RA, DNAAJ1P4, TAAR3) , 7q21.11, 9q22 (CDK20, NFIL3, DIRAS2) , 9q31.1-33.1 (ASTN2, TRIM32) , 9q33 (ASTN2, TRIM32) , 12p13.33, 14q12 (PRKDI) , 15q11.2-13.3 (CHRNA7) , 16p12.3-12.2 (GPRC5B) , 16q24.1, 18q11.2-12.3
11 Rommelse et al., 2008	EG	Parelles de germans	Caucàsica	238 individus amb TDAH, i els seus 112 germans afectats i 195 sans	2p25.1, 2p25.2, 2q14.3, 2q21.1 , 3p24.3, 4q35.2, 8q22.3, 9p21.2, 12p13.33, 12q23.3, 13q12.11 , 14q32.13, 17q12
12 Amin et al., 2009	EG	Llimatege	Caucàsica	9 pacients	1p36, 5q33, 6p12, 6p22, 6q15, 15q25, 18p11, 18q21, 18q22
13 Arcos-Burgos et al., 2010	EG	Llimatege	Païsa i caucàsica (rèplica)	18 famílies multi-generacionals amb 433 individus, i 137 famílies nuclears amb 527 individus. Rèplica en 1.410 famílies amb 6.360 individus	4q13.2 (LPHN3)
14 Vegt et al., 2010	EG	Llimatege	Caucàsica	24 membres d'una família	7p15.1-q31.33, 14q11.2-22.3
15 Saviouk et al., 2011	EG	Parelles de germans	Caucàsica	711 famílies amb 3.412 individus	2p25.1 (ID2) , 3p24.3-24.1, 8p23.3-23.2, 18q21.1-22.3, 18q21.31-21.32 (CPLX4, MC4R)
16 Ogdie et al., 2006	EG	Meta-anàlisi	Caucàsica	424 parelles de germans afectats (dels estudis 3 i 4)	5p13 (GDNF, SLC1A3)
17 Zhou et al., 2008	EG	Meta-anàlisi	Caucàsica	2.084 individus amb TDAH (dels estudis 3-5, 7-10)	5p15.32-q14.3, 6p21.1-q15, 6q15-23.2, 7p14.1-q21.11, 8p23.3, 9q21.32-31.1, 15p13, 16p13.3 (ZNF75A) , 16q23.1-24.3 (ATP2C2, CDH13) , 17p13.3

Nota: EG, estudis de lligament genètic a escala genòmica; RC, estudis de lligament genètic en regions candidates.

^a Les regions estadísticament significatives es mostren en negreta. Els gens candidats per al TDAH ubicats en les regions significatives es mostren entre parèntesi (adaptació de Li et al., 2014).

Per altra banda, en funció de l'existència o no d'una hipòtesi biològica prèvia que orienti l'estudi, també es pot distingir entre estudis d'associació de gens o regions candidates i estudis d'associació a escala genòmica (Zondervan i Cardon, 2007).

Estudis d'associació de gens o regions candidates

Aquest tipus d'estudis analitzen gens potencialment implicats en una malaltia o fenotip determinat, ja sigui per la funció biològica que exerceixen o pel fet d'estar ubicats en regions prèviament identificades a través d'estudis d'associació o de lligament genètic. Parteixen, per tant, d'una hipòtesi prèvia basada en el coneixement disponible sobre la patologia en qüestió (Pettersson et al., 2009).

Malgrat que els resultats obtinguts no sempre han estat consistents, des de la publicació, l'any 1995, del primer estudi d'associació en TDAH (Cook et al., 1995), s'han dut a terme un gran nombre d'investigacions que han proposat com a candidats més de cent vuitanta gens, dels quals aproximadament la meitat han mostrat una associació significativa amb el trastorn, com a mínim, en un estudi (Li et al., 2014). La cerca de gens de susceptibilitat al TDAH es centrà inicialment en el sistema de la neurotransmissió monoaminèrgica. En concret, el transportador de dopamina (*SLC6A3*) i el receptor dopaminèrgic D4 (*DRD4*) han estat els candidats més àmpliament investigats, si bé d'altres gens com els que codifiquen el receptor dopaminèrgic D5 (*DRD5*), el transportador de noradrenalina (*SLC6A2*), el receptor adrenèrgic α_{2A} (*ADRA2A*), el transportador de serotonina (*SLC6A4*), els receptors serotoninèrgics 1B i 2A (*HTR1B* i *HTR2A*) o els enzims dopamina β -hidroxilasa (*DBH*), catecol-O-metiltransferasa (*COMT*), monoamino oxidasa A (*MAOA*) i triptòfan hidroxilasa 2 (*TPH2*) també han rebut una atenció considerable (Akutagava-Martins, Salatino-Oliveira, Kieling, Rohde i Hutz, 2013; Li et al., 2014). De forma similar, els gens relacionats amb el complex SNARE (de l'anglès *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) que regula l'alliberament de neurotransmissors a l'espai sinàptic (p. e., *SNAP25*, de l'anglès *synaptosome-associated protein 25*) han estat considerats candidats interessants a participar en l'etiologia del TDAH, així com els responsables de codificar els factors neurotròfics i els seus receptors, entre els quals destaca *BDNF* (de l'anglès *brain-derived neurotrophic factor*) (Li et al., 2014; Ribasés et al., 2008; Sánchez-Mora et al., 2013). Finalment, els gens de la latrofilina 3 o el de l'intercanviador de Na^+/H^+ *SLC9A9* són altres exemples de candidats que han estat associats al trastorn a través d'aquesta estratègia, a més d'acumular evidències procedents d'estudis de lligament i d'associació a escala genòmica (Hawi et al., 2015; Li et al., 2014).

L'elevat nombre d'investigacions realitzades, en mostres generalment insuficients o amb resultats discordants, ha fet necessari l'ús d'estratègies meta-analítiques per tal d'establir conclusions consistents. D'entre totes les meta-anàlisis, la més completa fins ara és la de Gizer et al. en què s'investigaren un total de trenta-vuit variants diferents distribuïdes al llarg de divuit gens candidats. Els autors identificaren associacions significatives entre el TDAH i els gens *SLC6A3*, *DRD4*, *DRD5*, *SLC6A4*, *HTR1B* i *SNAP25*, malgrat que els efectes obtinguts foren modestos, amb *odds ratio* (OR) compreses entre 1,11-1,33, i que existien evidències d'heterogeneïtat entre els estudis (Gizer, Ficks i Waldman, 2009) (Taula 3).

Taula 3. Resultats meta-analítics significatius de l'associació entre polimorfismes en gens candidats i TDAH infantil

Gen	Localització	Polimorfisme	Al·lel de risc	Número d'estudis	OR (IC 95%)	Valor de P	Evidència d'heterogeneïtat (valor de P)
<i>SLC6A3</i>	3' UTR	VNTR	10 repeticions	34	1,12 (1,00-1,27)	0,028	<0,000001
	Intró 8	VNTR	3 repeticions	5	1,25 (0,98-1,58)	0,034	0,012
	3' UTR	rs27072	G	7	1,20 (1,04-1,38)	0,006	NS
<i>DRD4</i>	Exó 3	VNTR	7 repeticions	26	1,33 (1,15-1,54)	0,00007	0,0006
	Promotor	rs1800955	T	5	1,21 (1,04-1,41)	0,007	NS
<i>DRD5</i>	Extrem 5'	Repetició de dinucleòtid	148 pb	9	1,23 (1,06-1,43)	0,0027	NS
<i>SLC6A4</i>	Promotor	5HTTLPR	Llarg	19	1,17 (1,02-1,33)	0,010	0,00003
<i>HTR1B</i>	Exó 1	rs6296	G	9	1,11 (1,02-1,20)	0,010	NS
<i>SNAP25</i>	3' UTR	rs3746544	Desconegut	7	1,15 (1,01-1,31)	0,030*	NS

Nota: IC, interval de confiança; UTR, regió no codificant (de l'anglès *untranslated region*); VNTR, nombre variable de repeticions en tàndem; NS, no significatiu.

Tots els valors de P reportats corresponen a tests unilaterals, excepte si s'acompanyen d'un *, que indica que es tracta de proves bilaterals (adaptació de Gizer et al., 2009).

Estudis d'associació a escala genòmica

Els estudis d'associació a escala genòmica (GWAS, de l'anglès *genome-wide association studies*) avaluen centenars de milers o milions d'SNP distribuïts al llarg de tot el genoma, fet que permet la identificació de factors genètics de risc per a una malaltia determinada sense necessitat d'una hipòtesi prèvia, a diferència dels estudis de gens o regions candidates (Akutagava-Martins et al., 2013; Gallo i Posner, 2016). Aquest tipus d'investigacions han estat possibles gràcies als avenços produïts en les tècniques de genotipació d'alt rendiment i a la disponibilitat de bases de dades amb informació detallada sobre els genomes de milers d'individus en múltiples poblacions. En base als patrons de desequilibri de lligament (LD, de l'anglès *linkage disequilibrium*) existents entre les diferents variants en una població determinada, se seleccionen col·leccions d'SNP que capturen la major part de la variabilitat

genètica del genoma i s'evita, així, recollir informació redundant (Balding, 2006; Zondervan i Cardon, 2007). Com a conseqüència, les variants associades a una patologia poden no ser funcionals però trobar-se en LD amb la veritable variant causal, que no ha estat genotipada (Balding, 2006). Actualment, el recurs més utilitzat com a panell de referència és el Projecte 1000 Genomes (1000 Genomes Project Consortium et al., 2015), que facilita dades sobre més de 84 milions d'SNP en 2.504 individus de vint-i-sis poblacions diferents. L'ús d'aquesta informació ha permès desenvolupar mètodes computacionals capaços d'inferir els al·lels de les variants que no han estat directament genotipades en un estudi per mitjà d'un procés anomenat imputació (Halperin i Stephan, 2009).

Donat aquest escenari i l'existència de certes limitacions associades als estudis de lligament i de regions candidates, els GWAS han esdevingut recentment la principal estratègia per a la investigació dels trastorns complexos. Pel que fa al TDAH, en els darrers anys s'han realitzat múltiples GWAS tant en població infantil com adulta, set dels quals avaluaren trets quantitius com la simptomatologia o l'edat d'aparició del trastorn (Taula 4). Els resultats d'aquest tipus d'estudis suggerien la participació de gens implicats en processos com la divisió i adhesió cel·lular, la neurotransmissió, la plasticitat sinàptica, la migració neuronal o la senyalització a través de canals de potassi (Banaschewski, Becker, Scherag, Franke i Coghill, 2010; Franke, Neale i Faraone, 2009). D'entre ells, un dels més prometedors és el de la cadherina 13 (*CDH13*), una glicoproteïna d'adhesió cel·lular amb efectes reguladors sobre el creixement axonal que ha estat identificada entre els *top hits* de tres GWAS independents (Lasky-Su, Neale et al., 2008; Lesch et al., 2008; Neale, Medland, Ripke, Anney et al., 2010), a més d'ubicar-se a la regió 16q23-16q24 detectada en una meta-anàlisi de set estudis de lligament a escala genòmica (Zhou et al., 2008).

No obstant això, cap de les associacions reportades superava el llindar de significació genòmica ($P \leq 5 \times 10^{-8}$), motiu pel qual diversos estudis apostaren per complementar l'anàlisi de marcadors individuals (anàlisi basada en SNP) amb estratègies com l'anàlisi basada en gens o l'anàlisi de vies, que consideren la significació global d'un conjunt de marcadors en una determinada regió, categoria funcional o via de senyalització i permeten calcular l'enriquiment o sobrerepresentació de gens implicats en una determinada funció o procés biològic. D'aquesta manera, Poelmans et al. integraren els millors resultats obtinguts fins l'any 2011 a través de cinc GWAS diferents i identificaren un enriquiment significatiu en categories relacionades amb el neurodesenvolupament com ara el creixement de neurites (Poelmans, Pauls, Buitelaar i Franke, 2011).

Taula 4. Estudis d'associació a escala genòmica en TDAH (incloses les meta-anàlisis)

Estudi	Disseny	Mostra	Número d'SNP	Gens reportats (en base a SNP amb $P < 1 \times 10^{-5}$)
Lasky-Su, Anney et al., 2008	Familiar Edat d'aparició (tret quantitatiu)	930 trios	429.981	ADAMTS2, SULF2
Lasky-Su, Neale et al., 2008	Familiar Simptomatologia (tret quantitatiu)	909 trios	429.981	GFOD1, CDH13, PTCH1, PTHLH, IL16, RNF144B, MTA3, RDH10, LPL, LOC100505836, RHOC, NCKAP5, SLCO3A1, TGFB2, GUCY1A2, SYT16, ZNF423, HASS3, TLE4, LOC100506534, GRIK1, MEIS2, LARGE, SPATA13, DMRT2, NR4A2, OTOL1, CLYBL, LRRRC7, FOXP1, ZNF805, LOC101059934, FAM189A1, EREG, FHIT, ZNF544, CNTNAP4, NAPRT1, MBOAT1, LOC643542, CNTNAP5, ZMAT4, DPP10
Lesch et al., 2008	Cas-control	343 casos i 304 controls	504.219	MOBP, GPC6, C9orf98, ITGAI1, ITGAE, ASTN2, MGC33657, CSMD2, AK094352, ATP2C2, MAN2A2, DNMI, MAP1B, TLL2, TFEF, MMP24, UNC5B, C10orf79, CREB5, NTSDDC3, SUPT3H, PPM1F, CDH13, REEP5, MYT1L, CRYGC, CTNNA2
Neale et al., 2008	Familiar	909 trios	438.784	NS
Mick et al., 2010	Familiar	735 trios	835.136	C21orf34, EMP2, CCDC46, BMPR1B, ATPBD4, LOC389365, UGT1A9, SLC9A9, ELOVL6, LOC643308, TMEM16E
Neale, Medland, Ripke, Anney et al., 2010	Cas-control	896 casos i 2.455 controls	1.033.244 imputats	PRKGI, FLNC, TCERG1L, PPM1H
Neale, Medland, Ripke, Asherson et al., 2010	Meta-anàlisi	2.064 trios, 896 casos i 2.455 controls	1.206.462 imputats	SHFMI, CDH26, CHMP7, SLCO5A1, TRIQK, TSHZ2
Hinney et al., 2011	Cas-control	495 casos i 1.300 controls	487.484	BCL11A, GRM5, KIAA1267, PSMC3, CLASP2
Fliers et al., 2012	Familiar Funcions motores (tret quantitatiu)	890 trios	2.543.285 imputats	SLC7A2
Stergiakouli et al., 2012	Cas-control	727 casos i 5.081 controls	502.702	IL20RA, HOXB1, TRIO, MAGI2, ATXN2
Ebejer et al., 2013	Simptomatologia (tret quantitatiu)	1.851 individus d'una cohort poblacional de bessons	2.373.249 imputats	DPP6, CPLX2, GPR139, LINC00494, LOC100287010, DNMT3B, MAPRE1, TEXA1, LINC01183, NDN, PARD3B, FRMD1, LOC392232, BAALCOS
Yang et al., 2013	Cas-control	1.040 casos i 963 controls	656.051	NCL, TMX3, GRIK4, ARSB

Taula 4. Continuació

Estudi	Disseny	Mostra	Número d'SNP	Gens reportats (en base a SNP amb P < 1 × 10⁻⁵)
Alemaný et al., 2015	Síntomes d'inatenció (tret quantitatiu)	479 individus amb TDAH	799.713	<i>ACOXL, SORCS2, NUAK1, LOC286114, ASB17, BC037384, DST, ZNF831, ZNF622, FGF20, MSH4, BTBD9, DLG2, CAAP1, CHRNA4, LOC440970, TOP3B, MIR572, NELL1, SALL3, ARHGEF3, NBPFF22P, BC030092, CCDC66, NETO1, SS18</i>
Sánchez-Mora et al., 2015	Cas-control	603 casos i 583 controls	794.090	<i>KCNG4, COPA, PEX19, PCDH17, FBXO33, DDYNLRB2</i>
Zayats et al., 2015	Cas-control	478 casos i 880 controls	598.384	<i>ENSG00000263745, ZBTB16, TRIM36</i>
Brevik et al., 2016	Agressivitat (tret quantitatiu) Meta-anàlisi	1.060 pacients adults i 750 infants amb TDAH	7.576.458 imputats (adult) i 1.871.025 imputats (infants)	<i>MAP10, ADAM12, C9orf47, ST18, SUPT3H, ATP5G2P2, MLLT1, BMP7, EDNI, TTL8</i> Meta-anàlisi: <i>LOC101929236, NTM, CSMD1, KRT18P42, TEPP, CPNE4, MICAL2, LOC101927464, H3F3A, LOC105370057, ACBD3, LOC101929156, LOC105376469, LOC105373223, SPINK2, PHLPP1, UFM1</i>
Middeldorp et al., 2016	Síntomatologia (tret quantitatiu) Meta-anàlisi	17.666 infants de nou cohorts poblacionals	5.260.671-6.245.251 imputats	<i>PBX4, ACTR3B, CALDI, LMOD2, FOXN3, LRRTM4, CUX1, NRL, ARHGEF12</i>

Nota: NS, no significatiu.

De forma similar, Hawi i els seus col·laboradors detectaren que els gens més significativament associats al TDAH (definitos com aquells que contenien SNP amb un valor de $P \leq 1 \times 10^{-5}$) es trobaven sobrerrepresentats en processos biològics com el desenvolupament del sistema nerviós, la morfogènesi de projeccions neuronals i l'axonogènesi (Hawi et al., 2015) (Taula 5).

Per altra banda, les meta-anàlisis realitzades anteriorment, entre les quals destaca la de Neale et al. amb un total de 2.064 trios, 896 casos i 2.455 controls, tampoc foren capaces d'obtenir associacions significatives a escala genòmica (Neale, Medland, Ripke, Asherson et al., 2010). Aquest fet resulta congruent si es tenen en compte els estudis del consorci de psiquiatria genòmica (PGC, de l'anglès *Psychiatric Genomics Consortium*) en altres trastorns psiquiàtrics com l'esquizofrènia, a partir dels quals es desprèn la necessitat de mostres superiors als dotze mil individus (entre casos i controls) per assolir el llindar de significació genòmica (Franke et al., 2012). En aquest sentit, convé destacar que recentment el PGC ha identificat, a través d'una meta-anàlisi de GWAS que comprèn 20.183 casos de TDAH i 35.191 controls, tres-cents quatre variants genètiques en dotze *loci* independents amb un valor de $P \leq 5 \times 10^{-8}$ (Demontis et al., 2018).

1.2.1.3. Estudis de variants en el número de còpies

A més d'investigar variants genètiques comunes a través de les estratègies anteriorment esmentades, en els darrers anys, la recerca s'ha dirigit a avaluar alteracions cromosòmiques estructurals rares (prevalença a la població general <1%) amb efectes potencialment perjudicials, com és el cas dels CNV (Franke et al., 2012; Gallo i Posner, 2016).

Fins ara, en TDAH s'han realitzat deu estudis a escala genòmica, la majoria en mostres infantils d'ètnia caucàsica, amb l'objectiu de determinar el possible rol d'aquestes variants en l'etiologia del trastorn (Taula 6). D'entre ells, destaquen els resultats obtinguts pel grup de Williams i els seus col·laboradors, els quals observaren un excés de CNV amb una llargada superior a 500 kb entre els pacients en comparació amb els individus control (Williams et al., 2012; Williams et al., 2010). Els investigadors, a més, detectaren duplicacions en regions cromosòmiques (16p13.11 i 15q13.3) que contenen candidats plausibles per al TDAH com el gen del receptor nicotínic d'acetilcolina *CHRNA7*, implicat en la regulació de l'alliberament de dopamina (Seipel i Yakel, 2010). Altres anàlisis de CNV han revelat alteracions en els gens dels receptors glutamatèrgics *GRM1*, *GRM5*, *GRM7* i *GRM8* (Elia et al., 2010; Elia et al., 2011), i en gens prèviament associats a trastorns neurològics i psiquiàtrics com els que codifiquen la parkina 2 (*PARK2*) (Jarick et al., 2014) o el neuropèptid Y (*NPY*) (Lesch et al., 2011).

Taula 5. Anàlisi d'enriquiment gènic a partir de les associacions més significatives ($P \leq 1 \times 10^{-5}$) identificades als GWAS de TDAH

Categoria	Valor de P	Procés biològic	Gens
GO:0007399	5,06E-04	Desenvolupament del sistema nerviós	MOBP, AK8, PTCHI, BCL11A, CPLX2, MAP1B, GRM5, RHOC, TGFB2, ZNF423, DNMT3B, GRIK1, UNC5B, NDN, NR4A2, FOXPI, HOXB1, TRIO, MYTIL, MAGI2, ATXN2, CLASP2, CTNNA2, ARSB
GO:0048812 α	2,56E-03	Morfogènesi de projeccions neuronals	BCL11A, MAP1B, RHOC, TGFB2, UNC5B, NDN, NR4A2, FOXPI, TRIO, ATXN2, CLASP2, CTNNA2
GO:0007409 β	3,80E-03	Axonogènesi	BCL11A, MAP1B, RHOC, TGFB2, UNC5B, NDN, NR4A2, FOXPI, TRIO, CLASP2, CTNNA2
GO:0048731	4,80E-03	Desenvolupament sistèmic	CDH13, MOBP, AK8, ITGAI1, PTCHI, BCL11A, PTHLH, CPLX2, MAP1B, GRM5, RDH10, RHOC, TGFB2, TFEF, ZNF423, DNMT3B, GRIK1, UNC5B, MEIS2, CREB5, DMRT2, NDN, NR4A2, FOXPI, HOXB1, TRIO, MYTIL, CRYGC, EREG, MAGI2, ATXN2, CLASP2, CTNNA2, ARSB
GO:0060560	6,26E-03	Creixement del desenvolupament implicat en la morfogènesi	BCL11A, PTHLH, MAP1B, RDH10, NDN, MAGI2
GO:0007275 ψ	6,67E-03	Desenvolupament multicel·lular de l'organisme	CDH13, MOBP, AK8, ITGAI1, PTCHI, BCL11A, PTHLH, CPLX2, MAP1B, GRM5, TLL2, RDH10, RHOC, TGFB2, TFEF, ZNF423, DNMT3B, GRIK1, UNC5B, MEIS2, CREB5, DMRT2, NDN, NR4A2, FOXPI, HOXB1, TRIO, MYTIL, TSHZ2, CRYGC, EREG, MAGI2, ATXN2, PSMC3, CLASP2, CTNNA2, ARSB
GO:0031175 Φ	6,73E-03	Desenvolupament de projeccions neuronals	BCL11A, MAP1B, RHOC, TGFB2, UNC5B, NDN, NR4A2, FOXPI, TRIO, MAGI2, ATXN2, CLASP2, CTNNA2
GO:0048589	7,57E-03	Creixement del desenvolupament	BCL11A, PTHLH, MAP1B, RDH10, NDN, FOXPI, EREG, MAGI2
GO:0048699 ψ	1,40E-02	Generació de neurones	PTCHI, BCL11A, MAP1B, GRM5, RHOC, TGFB2, DNMT3B, UNC5B, NDN, NR4A2, FOXPI, TRIO, MAGI2, ATXN2, CLASP2, CTNNA2
GO:0040007	1,54E-02	Creixement	CDH13, PTCHI, BCL11A, PTHLH, MAP1B, RDH10, TGFB2, NDN, PPM1F, FOXPI, EREG, MAGI2, ATXN2
GO:0030182	1,96E-02	Diferenciació neuronal	PTCHI, BCL11A, MAP1B, RHOC, TGFB2, DNMT3B, UNC5B, NDN, NR4A2, FOXPI, TRIO, MAGI2, ATXN2, CLASP2, CTNNA2
KEGG:04724	2,71E-02	Sinapsi glutamàtica	GRM5, GRIK1, GRIK4
GO:0043616	3,06E-02	Proliferació de queratínocids	CDH13, PTCHI, EREG
KEGG:03050	3,87E-02	Proteosoma	SFPM1, PSMC3
GO:0030030	4,31E-02	Organització de projeccions cel·lulars	CDH13, BCL11A, MAP1B, RHOC, TGFB2, UNC5B, NDN, NR4A2, FOXPI, TRIO, MAGI2, ATXN2, CLASP2, CTNNA2

Nota: GO, de l'anglès *gene ontology*; KEGG, de l'anglès *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*. α = el mateix conjunt de gens es trobava significativament enriquit a les categories morfogènesi de projeccions cel·lulars (GO:0048858, $P=1,90E-02$) i morfogènesi d'una part cel·lular (GO:0032990, $P=2,30E-02$). β = el mateix conjunt de gens es trobava significativament enriquit a les categories desenvolupament axonal (GO:0061564, $P=5,2E-03$) i morfogènesi cel·lular implicada en la diferenciació neuronal (GO:0048667, $P=1,04E-02$). ψ = el mateix conjunt de gens es trobava significativament enriquit a les categories neurogènesi (GO:0022008, $P=2,66E-02$), processos de desenvolupament d'un únic organisme (GO:0048856, $P=4,85E-02$), desenvolupament de l'estructura anatómica (GO:0048856, $P=4,85E-02$) i processos d'un únic organisme multicel·lular (GO:0044707, $P=5,00E-02$). Φ = el mateix conjunt de gens es trobava significativament enriquit a la categoria desenvolupament neuronal (GO:0048666, $P=2,61E-02$) (adaptació de Hawi et al., 2015).

De forma similar, molts dels CNV identificats en TDAH es troben significativament enriquits en gens relacionats amb l'autisme, l'esquizofrènia i la síndrome de Tourette (Elia et al., 2010; Lionel et al., 2011; Williams et al., 2012; Williams et al., 2010), fet que reforça l'existència d'una base genètica compartida entre aquests trastorns del neurodesenvolupament. Finalment, Stergiakouli et al. aportaren evidències sobre la implicació conjunta de les variants genètiques comunes i rares en el desenvolupament del TDAH. En una investigació en què combinaren els resultats d'estudis de GWAS i de CNV, els autors detectaren que els SNP amb tendència a la significació genòmica inflüen les mateixes vies biològiques que les alteracions estructurals associades al trastorn (Stergiakouli et al., 2012).

Taula 6. Estudis de variants en el número de còpies a escala genòmica en TDAH

Estudi	Disseny	Ètnia	Mostra	Mida de la mostra	CNV reportats ^a	CNV <i>de novo</i>
Elia et al., 2010	Cas-control i basat en famílies	Caucàsica	Infants i adolescents	335 trios i 2.026 controls	222	N/A ^b
Williams et al., 2010	Cas-control	Caucàsica	Infants i adolescents	410 casos i 1.156 controls de la 1958 <i>British Birth Cohort</i>	57	6
Lesch et al., 2011	Cas-control i basat en famílies	Caucàsica	Infants i adolescents	99 casos i 100 controls	17	2
Lionel et al., 2011	Cas-control	Mescla	Infants i adolescents	248 pacients i 2.357 controls	23	4
Elia et al., 2012	Cas-control	Caucàsica	Infants i adolescents	1.013 casos i 4.105 controls	19	12
Jarick et al., 2012	Cas-control	Caucàsica	Infants i adolescents	489 casos i 1.285 controls	50	N/A
Stergiakouli et al., 2012b	Cas-control	Caucàsica	Infants i adolescents	799 casos i 6.000 controls	0	0
Williams et al., 2012	Cas-control	Caucàsica	Infants i adolescents	896 casos i 2.455 controls	460	N/A
Yang et al., 2013	Cas-control	Xinesa	Infants i adolescents	1.040 casos i 963 controls	6	N/A
Ramos-Quiroga et al., 2014	Cas-control	Caucàsica	Adults	400 casos i 526 controls	367	N/A

CNV, variants en el número de còpies.

^a Número de CNV identificats únicament en pacients amb TDAH.

^b N/A indica que no es van reportar CNV *de novo* a l'estudi (adaptació de Li et al., 2014).

1.2.2. Factors ambientals

Nombrosos estudis descriuen la influència de diversos factors ambientals, especialment al llarg de les etapes pre i perinatals, en el desenvolupament i gravetat del TDAH. És el cas de l'exposició prenatal al tabac, l'alcohol o tòxics com el plom, els bifenils policlorats (PCB, de l'anglès *polychlorinated biphenyls*) o els pesticides organofosforats, i de complicacions durant la gestació i el part com la prematuritat o el baix pes en néixer (Banerjee et al., 2007; Thapar, Cooper, Eyre i Langley, 2013). D'entre ells, el que ha mostrat una associació més consistent amb l'aparició de símptomes de TDAH en la descendència és el consum de tabac durant l'embaràs per part de la mare (Button, Thapar i McGuffin, 2005; Koshy, Delpisheh i Brabin, 2011; Langley, Rice, van den Bree i Thapar, 2005; Linnert et al., 2003; Linnert et al., 2005; Silva, Colvin, Hagemann i Bower, 2014; Thapar et al., 2003; Weitzman, Byrd, Aligne i

Moss, 2002). Els resultats pel que fa a l'alcohol, en canvi, són contradictoris (Linnet et al., 2003), malgrat les evidències sobre els seus efectes teratògens i perjudicials en el sistema nerviós central, responsables d'importants patologies físiques, neurològiques i mentals com la síndrome alcohòlica fetal, que es manifesta, entre d'altres, amb símptomes d'inatenció i hiperactivitat (Linnet et al., 2003; Thapar, Cooper, Jefferies i Stergiakouli, 2012). De forma similar, els tòxics ambientals com el plom, els pesticides o els PCB també causen danys significatius a nivell cognitiu i comportamental com a resultat de processos d'estrès oxidatiu. En aquest sentit, diverses investigacions indiquen que la contaminació per plom pot produir un quadre clínic semblant al TDAH, caracteritzat per distracció, hiperactivitat, inquietud i deteriorament intel·lectual (Nigg, 2008; Nigg, Nikolas, Mark Knottnerus, Cavanagh i Friderici, 2010). Altres estudis han relacionat l'exposició prenatal a PCB amb dificultats en la capacitat de concentració i d'atenció, així com amb falta de precisió en l'execució i lentitud en el temps de resposta (Schantz, Widholm i Rice, 2003). Per altra banda, d'entre les diferents complicacions obstètriques associades al TDAH (p. e., la toxèmia o l'eclàmpsia, l'edat de la mare, la durada del part o l'estrès fetal) (Banerjee et al., 2007), destaquen la prematuritat i el baix pes en néixer. Ambdues han estat identificades repetidament com a factors de susceptibilitat per al trastorn, incloent una meta-anàlisi basada en 4.125 casos i 3.197 individus control que reportà una major prevalença de dèficits atencionals entre els infants nascuts de forma prematura o amb un pes molt baix (Aarnoudse-Moens, Weisglas-Kuperus, van Goudoever i Oosterlaan, 2009).

En etapes posteriors del desenvolupament, factors com l'adversitat psicosocial o la dieta també poden exercir una influència destacable en l'etiologia del trastorn. Així, per exemple, s'han descrit diverses circumstàncies (nivell sociocultural baix, ingressos econòmics escassos, conflictes familiars, negligència, assetjament, maltractament, etc.) que tendeixen a incrementar el risc de presentar TDAH i que sovint contribueixen a agreujar-ne les manifestacions amb l'aparició de trastorns comòrbids com el trastorn de conducta o símptomes depressius (Banerjee et al., 2007; De Sanctis, Nomura, Newcorn i Halperin, 2012; Freitag et al., 2012; Thapar et al., 2012). Respecte a la dieta, les diferents investigacions s'han centrat principalment en l'estudi dels efectes de components alimentaris com els sucres refinats o els additius i colorants artificials, i de determinades deficiències nutricionals (p. e., en zinc, magnesi o àcids grassos poliinsaturats) sobre la simptomatologia del TDAH. No obstant això, els resultats obtinguts fins ara són poc conclouents (Banerjee et al., 2007; Singh et al., 2015; Thapar et al., 2012).

1.3. Interacció gen × ambient

La majoria de variants genètiques identificades fins al moment només expliquen una petita proporció de l'heretabilitat estimada per al TDAH i la seva associació, en general, no ha estat replicada de forma consistent. Aquestes discrepàncies en els resultats poden ser degudes, entre altres causes, a la influència de diferents variables ambientals, capaces de modular els efectes dels factors genètics a través d'interaccions gen × ambient ($G \times E$, de l'anglès *gene-environment interaction*). Parlem d'interacció $G \times E$ quan determinats factors ambientals contribueixen a la manifestació d'efectes genètics que no s'expressarien en altres circumstàncies o bé quan els gens alteren la sensibilitat dels individus a factors ambientals de risc (Figura 4) (Coghill i Banaschewski, 2009; Wermter et al., 2010).

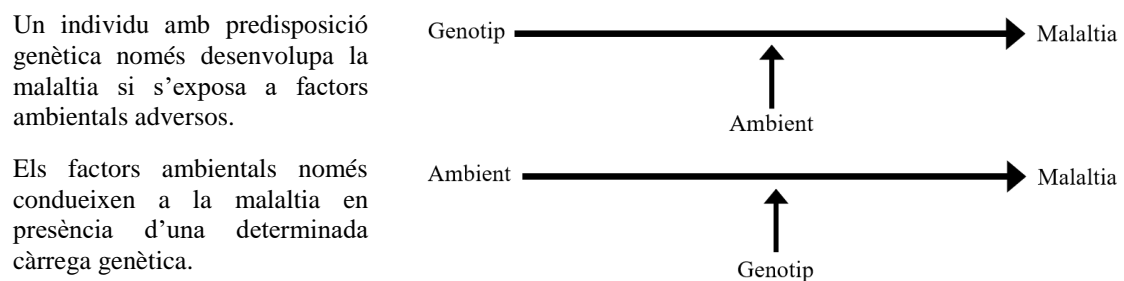


Figura 4. Exemples d'interacció entre factors genètics i factors ambientals (adaptació de Wermter et al., 2010).

Pel que fa al TDAH, les escasses investigacions sobre $G \times E$ que s'han portat a terme han avaluat la interacció entre gens candidats, fonamentalment del sistema dopaminèrgic i serotoninèrgic, i l'exposició a factors ambientals de risc com el consum matern de tabac i alcohol durant l'embaràs, el baix pes en néixer o l'adversitat psicosocial (Nigg, Nikolas i Burt, 2010; Pennington et al., 2009; Wermter et al., 2010).

En aquest sentit, Kahn i els seus col·laboradors observaren que l'al·lel de deu repeticions (10R) del gen *SLC6A3* es trobava associat a comportaments hiperactius/impulsius i oposicionistes únicament en els nens que havien estat exposats a tabac dins l'úter (Kahn, Khoury, Nichols i Lanphear, 2003), uns resultats que foren parcialment confirmats pel grup de Becker (Becker, El-Faddagh, Schmidt, Esser i Laucht, 2008). Neuman et al., en canvi, no trobaren cap interacció significativa entre l'exposició prenatal al tabac i l'al·lel 10R però sí per a l'al·lel 9R del mateix gen, la presència del qual incrementava el risc de ser diagnosticat amb el subtipus de TDAH combinat (Neuman et al., 2007). A més d'aquests estudis, n'existeixen d'altres que han explorat els efectes del consum de tabac durant l'embaràs en

combinació amb gens diferents de *SLC6A3* com *DRD4*, *DRD5*, *SLC6A4* o *CHRNA4* (Altink et al., 2008; Langlely et al., 2008; Neuman et al., 2007; Todd i Neuman, 2007). Els resultats pel que fa a l'alcohol han estat igualment discordants. D'una banda, el grup de Brookes identificà que els nens amb TDAH presentaven més freqüentment un haplotip de *SLC6A3* associat al trastorn si les mares havien consumit alcohol mentre estaven embarassades (Brookes et al., 2006). De l'altra, Langlely et al. no detectaren una interacció significativa en el diagnòstic de TDAH entre l'exposició prenatal a l'alcohol i cap dels gens investigats però sí un efecte modulador dels símptomes de trastorn de conducta com a resultat de l'acció conjunta entre els gens *SLC6A3* i *DRD5*, i el baix pes en néixer (Langlely et al., 2008). De forma similar, un estudi anterior revelà una major incidència de comportaments antisocials en els infants amb TDAH portadors de la forma menys activa d'un polimorfisme funcional de la *COMT* i amb un pes inferior a 2,5 kg en el moment del naixement (Thapar et al., 2005). A part de les variables ambientals prenatales, els factors de risc psicosocial també han rebut una atenció considerable en relació a l'estudi de les interaccions $G \times E$ potencialment implicades en l'etiologia del TDAH. L'any 2007, Laucht i els seus col·laboradors evidenciaren que els adolescents amb l'haplotip de risc a *SLC6A3* que havien crescut en un entorn familiar advers exhibien més símptomes d'inatenció i hiperactivitat/impulsivitat que els que presentaven altres genotips o havien viscut en condicions menys desfavorables (Laucht et al., 2007). En la mateixa línia, Waldman suggerí que els nens portadors d'al·lels de risc al gen *DRD2* tenien més probabilitats de ser diagnosticats amb TDAH si les relacions sentimentals de les mares eren inestables (Waldman, 2007). Finalment, altres gens que també han mostrat un efecte $G \times E$ significatiu sobre el diagnòstic i els símptomes del TDAH en presència de circumstàncies adverses durant la infantesa són *SLC6A4*, *MAOA* i *BDNF* (Lasky-Su et al., 2007; Li i Lee, 2012; Müller et al., 2008; Retz et al., 2008).

1.4. Tractament

L'abordatge terapèutic del TDAH inclou tant mesures educatives, psicològiques i socials com tractaments farmacològics i té com a objectiu estabilitzar els símptomes del trastorn i proporcionar eines als pacients que els permetin adaptar-se a les exigències de l'entorn per tal de millorar la seva qualitat de vida.

1.4.1. Tractament no farmacològic

Existeix un ampli ventall d'estratègies no farmacològiques dirigides a controlar les manifestacions del trastorn i a reduir el deteriorament funcional que provoquen. Malgrat que la seva eficàcia és menor a la dels tractaments farmacològics, aquestes intervencions s'utilitzen, en general, com a precursors o complements de la farmacoteràpia i incideixen fonamentalment sobre la conducta, la cognició i la dieta (Faraone i Antshel, 2014; Sonuga-Barke et al., 2013).

Les intervencions conductuals són, d'entre totes les opcions no farmacològiques, les més ben establertes, recomanades i emprades. Inclouen tècniques, com l'educació dels pares, les intervencions en l'àmbit escolar o l'entrenament d'habilitats socials, d'autocontrol i compensatòries, que pretenen promoure els comportaments apropiats i disminuir els no desitjats per mitjà d'un sistema d'aprenentatge basat en reforços positius i negatius (Piffner i Haack, 2014). Tot i la manca d'evidències pel que fa a la reducció dels símptomes del TDAH, s'ha demostrat que aquestes estratègies repercuteixen positivament en les relacions familiars i els problemes de conducta dels pacients, a més de reduir els dèficits funcionals i la dosi de fàrmac requerida quan s'utilitzen en combinació amb la medicació (Daley et al., 2014; Mongia i Hechtman, 2012; MTA Cooperative Group, 1999).

Per altra banda, existeixen estudis que palesen la utilitat de tècniques neurocognitives en la millora de determinats símptomes i funcions. Una de les estratègies més emprades, especialment per al tractament del dèficit d'atenció, és el *neurofeedback* o retroalimentació electroencefalogràfica que consisteix en entrenar el pacient per tal que sigui capaç de normalitzar els patrons d'activitat cerebral que es troben alterats (Arns, de Ridder, Strehl, Breteler i Coenen, 2009; Holtmann, Sonuga-Barke, Cortese i Brandeis, 2014). Altres aproximacions neurocognitives, entre elles el *mindfulness*, es basen també en l'entrenament continuat per millorar funcions com la memòria de treball, la inhibició o la regulació dels processos atencionals, malgrat que actualment no es disposa d'evidències suficients per a la seva aplicació en el TDAH (Cortese et al., 2015; Sonuga-Barke, Brandeis, Holtmann i Cortese, 2014).

Finalment, les intervencions consistents en la incorporació a la dieta de suplementes com els àcids grassos poliinsaturats o l'exclusió de determinats components (p. e., els additius artificials) han demostrat ser beneficioses en individus amb intoleràncies alimentàries o en casos lleus de TDAH, si s'utilitzen com a complement de la farmacoteràpia (Königs i Kiliaan, 2016; Nigg i Holton, 2014; Stevenson et al., 2014).

1.4.2. Tractament farmacològic

El tractament farmacològic està indicat com a part d'un programa integral en nens a partir de sis anys amb formes greus del trastorn o que no responen a les intervencions no farmacològiques (Atkinson i Hollis, 2010) i comprèn dos tipus de medicacions; la medicació psicoestimulant i la no psicoestimulant. La selecció del fàrmac es basa en una rigorosa avaluació de la gravetat, la presència de comorbiditats i el moment del dia en què es requereix preferiblement un alleugeriment dels símptomes (Faraone et al., 2015). Nombrosos anàlisis indiquen que tant els fàrmacs psicoestimulants com els no psicoestimulants redueixen adequadament els símptomes del TDAH en infants i adults, malgrat que els primers són, en general, més efectius (Faraone, Biederman, Spencer i Aleardi, 2006; Faraone i Glatt, 2010; Newcorn et al., 2008). Per aquest motiu, es considera que la medicació psicoestimulant constitueix el tractament farmacològic de primera elecció en pacients de totes les edats (Atkinson i Hollis, 2010; Bolea-Alamañac et al., 2014; Pliszka i AACAP Work Group on Quality Issues, 2007), especialment el metilfenidat (MPH, de l'anglès *methylphenidate*) que actua com a inhibidor de la recaptació de dopamina i noradrenalina. Les amfetamines, en concret la lisdexamfetamina, també bloquegen la recaptació d'aquests neurotransmissors i representen una alternativa al MPH per als casos en què la resposta resulta clínicament inadequada. A més, afavoreixen l'alliberament de monoamines a l'espai sinàptic i n'inhibeixen la degradació a nivell presinàptic (Fleckenstein, Volz, Riddle, Gibb i Hanson, 2007; Heal, Smith, Gosden i Nutt, 2013). Existeixen altres fàrmacs psicoestimulants com la pemolina o el modafinil que, tot i ser efectius en relació a la simptomatologia del TDAH, actualment no han estat aprovats per al seu tractament a Espanya (Kahbazi et al., 2009; Kaplan i Newcorn, 2011; Stevenson i Wolraich, 1989; Wilens et al., 1999).

Malgrat que els efectes secundaris dels fàrmacs psicoestimulants són, en general, lleus i transitoris, la manca de tolerabilitat constitueix un dels principals motius d'abandonament de la teràpia (Gajria et al., 2014). Entre les reaccions adverses més comunes destaquen l'insomni, la disminució de l'apetit, cefalees, dolor abdominal, disfòria i irritabilitat. També s'han descrit efectes adversos més greus, tot i que poc freqüents, com l'aparició de tics, ansietat, agressió, depressió, psicosi i mania (Aagaard i Hansen, 2011; Feldman i Reiff, 2014; Montañés-Rada, Gangoso-Fermoso i Martínez-Granero, 2009). Finalment, alguns estudis han associat el tractament amb psicoestimulants a un lleu retard en el creixement (Faraone, Biederman, Morley i Spencer, 2008) o a alteracions cardiovasculars importants,

motiu pel qual convé utilitzar aquests fàrmacs amb prudència en pacients amb patologies cardíques preexistents (Dalsgaard, Kvist, Leckman, Nielsen i Simonsen, 2014; Warren et al., 2009). Davant la presència de tics, ansietat, depressió o trastorns per ús de substàncies es recomana també extremar la precaució.

En aquestes circumstàncies, així com en els casos en què els pacients no responen o no toleren la medicació psicoestimulant, és preferible l'ús de fàrmacs no psicoestimulants (Atkinson i Hollis, 2010; Faraone et al., 2015; Kaplan i Newcorn, 2011) entre els quals destaca l'atomoxetina, un inhibidor selectiu de la recaptació de noradrenalina indicat per al tractament del TDAH en infants, adolescents i adults (Spencer, Biederman i Wilens, 2004; Tanaka, Rohde, Jin, Feldman i Upadhyaya, 2013; Wigal, 2009). En general, es tracta d'un fàrmac segur amb un perfil d'efectes adversos que inclou, principalment, cefalea, dolor abdominal, disminució de l'apetit, somnolència, nàusees, vòmits, augment de la pressió arterial i de la freqüència cardíaca (Schwartz i Correll, 2014).

Els agonistes dels receptors adrenèrgics α_2 , com la clonidina i la guanfacina, inicialment utilitzats com a antihipertensius, també han estat aprovats per al tractament del TDAH en alguns països. No obstant això, els seus efectes sedants en limiten l'ús en alguns pacients i, concretament, a Espanya només s'accepta aquesta indicació per a la guanfacina (Biederman et al., 2008; Jain, Segal, Kollins i Khayrallah, 2011; Sallee, Connor i Newcorn, 2013).

Finalment, existeixen altres fàrmacs potencialment útils per alleugerir els símptomes del trastorn però que no han estat aprovats encara per al seu tractament. És el cas dels antidepressius tricíclics o el bupropió (Maneeton, Maneeton, Intaprasert i Woottiluk, 2014; Verbeeck, Tuinier i Bekkering, 2009). Els antidepressius tricíclics, principalment la imipramina, la desipramina i la nortriptilina, bloquegen la recaptació de noradrenalina i serotonina i han de ser utilitzats amb precaució ja que augmenten el risc d'arrítmia (Wilens et al., 1996), a més de produir amb freqüència efectes adversos molestos com sequedat de boca, restrenyiment, visió borrosa, retenció urinària, sedació o augment de pes (Warikoo i Faraone, 2013). El bupropió, en canvi, és un inhibidor de la recaptació de dopamina i noradrenalina que, malgrat presentar un perfil d'eficàcia i seguretat comparable al del MPH en nens i adolescents amb TDAH (Maneeton et al., 2014), actualment està indicat exclusivament per al tractament d'episodis de depressió major.

Per últim, en pacients que no responen al tractament amb un únic fàrmac pot resultar eficaç la teràpia combinada amb psicoestimulants i atomoxetina o agonistes adrenèrgics α_2 (Treuer et al., 2013).

2. FARMACOGENÈTICA DEL MPH

Malgrat que sovint els termes farmacogenètica i farmacogenòmica s'utilitzen indistintament, convé diferenciar ambdues disciplines. La farmacogenètica estudia com les variacions en gens implicats en la farmacocinètica i farmacodinàmica dels fàrmacs influeixen la resposta i els efectes adversos a la medicació. Així, per exemple, s'han descrit diferències en la capacitat metabòlica dels individus com a conseqüència de polimorfismes genètics en enzims metabolitzadors que n'augmenten o disminueixen l'activitat. El tractament amb dosis de fàrmac estàndards pot resultar insuficient per assolir els nivells terapèutics i donar lloc a una resposta inadequada en els individus amb formes ultraràpides d'aquests enzims mentre que els metabolitzadors lents tendeixen a acumular el compost farmacològic actiu i poden presentar fenòmens relacionats amb la toxicitat. Per altra banda, variants genètiques en les dianes sobre les quals actuen els fàrmacs, com receptors o transportadors, poden alterar els processos moleculars que se'n deriven i conduir també al fracàs terapèutic o a l'aparició de reaccions adverses (Masellis et al., 2002; Weinshilboum, 2003). La farmacogenòmica, en canvi, investiga l'espectre de gens que determinen els efectes d'un fàrmac per mitjà de tècniques que permeten, entre d'altres, l'anàlisi massiva de variants polimòrfiques distribuïdes al llarg del genoma o de canvis en l'expressió gènica induïts per la medicació (Meyer, 2002; Phillips, Veenstra i Sadee, 2000).

Tant la farmacogenètica com la farmacogenòmica, doncs, ofereixen la possibilitat d'optimitzar els règims de tractament en base al perfil genètic dels individus amb l'objectiu d'augmentar-ne l'eficàcia i seguretat, i de millorar, en conseqüència, l'adherència terapèutica. D'aquesta manera, es podria evitar prescriure determinats compostos a persones amb risc de resistència al tractament o de presentar efectes adversos, en què molt probablement no serien beneficiosos (Froehlich, McGough i Stein, 2010; Masellis et al., 2002; McGough, 2005; Stein i McGough, 2008). La farmacogenòmica, a més, podria contribuir a elucidar el mecanisme d'acció dels fàrmacs amb el descobriment de noves dianes terapèutiques, cosa que permetria desenvolupar compostos més específics i eficaços (Masellis et al., 2002; Stein i McGough, 2008).

El TDAH representa una àrea d'estudi molt prometedora per a la farmacogenètica i la farmacogenòmica, atesa l'elevada heretabilitat del trastorn i l'existència d'una considerable variabilitat interindividual en la resposta i tolerabilitat a la medicació psicoestimulant (Froehlich

et al., 2010; Masellis et al., 2002; McGough, 2005). En aquest sentit, nombrosos estudis demostren que, malgrat ser considerats, en general, efectius i segurs, aproximadament un 30% dels pacients tractats amb fàrmacs psicoestimulants no responen adequadament o interrompen el tractament com a conseqüència, en la majoria dels casos, de l'aparició d'efectes adversos (Franke et al., 2012; Heal, Cheetham i Smith, 2009; Masellis et al., 2002; McGough, 2005; Wigal, 2009). D'entre ells, ens centrarem en el MPH pel fet de ser el més àmpliament estudiat.

2.1. Farmacodinàmica del MPH

A pesar que no es coneix amb exactitud el seu mecanisme d'acció, es creu que el MPH inhibeix la recaptació de dopamina i noradrenalina per part dels respectius transportadors presinàptics, fet que augmenta els nivells extracel·lulars d'aquests neurotransmissors, especialment al nucli estriat i al còrtex prefrontal, i en potencia la senyal endògena (Arnsten, 2011; Arnsten i Pliszka, 2011; Castellanos i Acosta, 2011). Per altra banda, estudis realitzats en animals suggereixen la contribució d'altres possibles mecanismes en els efectes terapèutics del MPH. Així, per exemple, el grup d'Adriani analitzà el perfil d'expressió estriatal de rates tractades amb MPH durant l'adolescència i detectà una sobreexpressió de gens implicats en processos de plasticitat sinàptica com la formació, maduració i estabilitat de noves connexions neurals (Adriani et al., 2006). De forma similar, estudis anteriors en diferents espècies ja havien demostrat que l'administració de MPH induïa canvis en els nivells de gens d'expressió ràpida, com els factors de transcripció c-fos i Egr1 o el factor de plasticitat sinàptica Homer 1a, al llarg de regions cerebrals potencialment implicades en el TDAH (Brandon i Steiner, 2003; Chase, Brown, Carrey i Wilkinson, 2003; Chase, Carrey, Brown i Wilkinson, 2005; Lin, Hou i Jouvét, 1996; Penner et al., 2002; Trinh, Nehrenberg, Jacobsen, Caron i Wetsel, 2003; Yano i Steiner, 2005a, 2005b).

2.2. Farmacocinètica del MPH

El MPH presenta dos carbonis asimètrics a la seva estructura química que donen lloc a quatre isòmers diferents (D-, L-eritro-MPH i D-, L-treo-MPH) (Figura 5). No obstant això, s'administra en forma d'una mescla racèmica constituïda únicament per l'enantiòmer D-treo, responsable dels efectes terapèutics, i L-treo (Kimko, Cross i Abernethy, 1999; Wolraich i Doffing, 2004).

La seva absorció és ràpida i quasi completa, de manera que la concentració plasmàtica màxima s'assoleix aproximadament 1-3 hores després de l'administració oral, tot i que existeix una àmplia variabilitat entre els individus (Kimko et al., 1999; Wolraich i Doffing, 2004). Gràcies a l'elevada liposolubilitat i al fet que s'uneix poc a proteïnes plasmàtiques, el MPH es distribueix amb rapidesa per tot l'organisme i accedeix fàcilment al sistema nerviós central (Kimko et al., 1999; Wolraich i Doffing, 2004). En concret, la concentració màxima

a nivell del cervell s'assoleix passats els 60 minuts quan el fàrmac s'administra oralment i en 5-15 minuts, si l'administració és intravenosa (Kimko et al., 1999; Wolraich i Doffing, 2004).

Pel que fa al metabolisme, es considera que la principal via metabòlica del MPH és la desesterificació enantioselectiva a àcid D- i L-ritalínic, catalitzada per diferents esterases hidrolítiques distribuïdes de forma ubiqua, entre les quals destaca la carboxilesterasa hepàtica 1 (Sun et al., 2004). El metabòlits resultants són farmacològicament inactius i s'eliminen extensament a través de l'orina després de 8-48 hores de l'administració oral de MPH. En menor proporció, s'ha descrit que les reaccions d'hidroxilació aromàtica, oxidació microsomal i conjugació també generen metabòlits inactius (Figura 6), si bé es tracta de vies molt

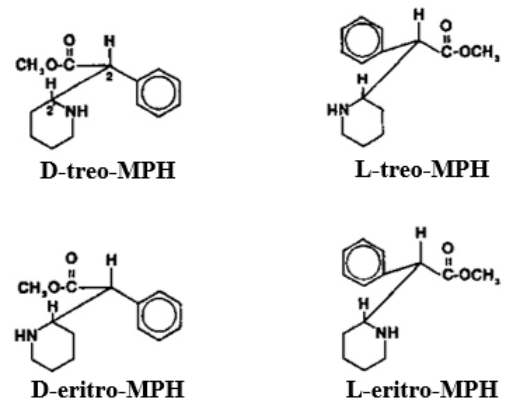


Figura 5. Estructura química del MPH amb els respectius enantiòmers (adaptació de Patrick, Caldwell, Ferris i Breese, 1987).

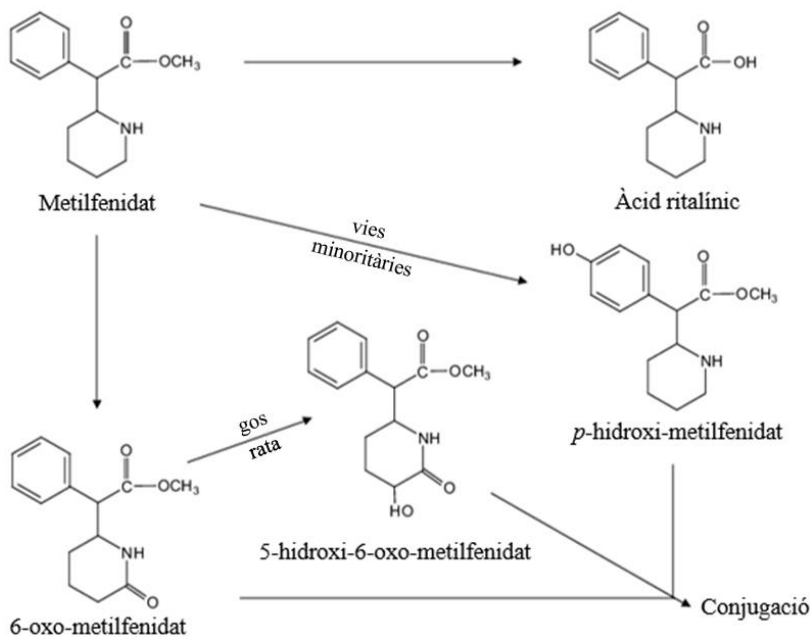


Figura 6. Metabolisme del MPH (adaptació de Kimko et al., 1999).

minoritàries (Kimko et al., 1999; Wolraich i Doffing, 2004). Com a resultat, el MPH té una vida mitjana curta i els seus efectes terapèutics s'estenen un màxim de 4 hores, motiu pel qual es requereix administrar el fàrmac entre dues i tres vegades al dia (Markowitz, Zhu i Patrick, 2013; Wolraich i Doffing, 2004).

L'aparició, en els darrers anys, de preparacions farmacèutiques amb una durada de l'efecte superior ha permès reduir el nombre de dosis diàries necessàries, fet que afavoreix el compliment del tractament per part dels pacients (Figura 7). Així, des de la formulació original, comercialitzada a Espanya partir de la dècada de 1980 com a Rubifen®, s'han desenvolupat formes d'alliberació intermèdia i prolongada amb una eficàcia similar a la del MPH d'alliberació immediata (Greenhill, Findling, Swanson i ADHD Study Group, 2002; Lyseng-Williamson i Keating, 2002; Wolraich et al., 2001). Les primeres (p. e., Medikinet®) ofereixen cobertura terapèutica durant aproximadament 8 hores gràcies a un sistema de microesferes amb dues fases d'alliberament diferenciades: una porció d'aquestes microesferes s'absorbeix de forma immediata mentre que l'altra es troba recoberta d'un polímer que tan sols es dissol en arribar a l'intestí (Loro-López et al., 2009; Montañés-Rada et al., 2009). En canvi, les preparacions d'alliberació prolongada com Concerta® es caracteritzen per utilitzar un sistema osmòtic anomenat OROS® (de l'anglès *Osmotic-Release Oral System*) que allibera MPH lenta i progressivament fins a un màxim de 12 hores després d'una única dosi (Loro-López et al., 2009; Montañés-Rada et al., 2009). Finalment, com a alternativa a l'administració oral, en alguns països es disposa d'un pegat transdèrmic capaç de mantenir els nivells de fàrmac estables durant 16 hores (Wolraich i Doffing, 2004).

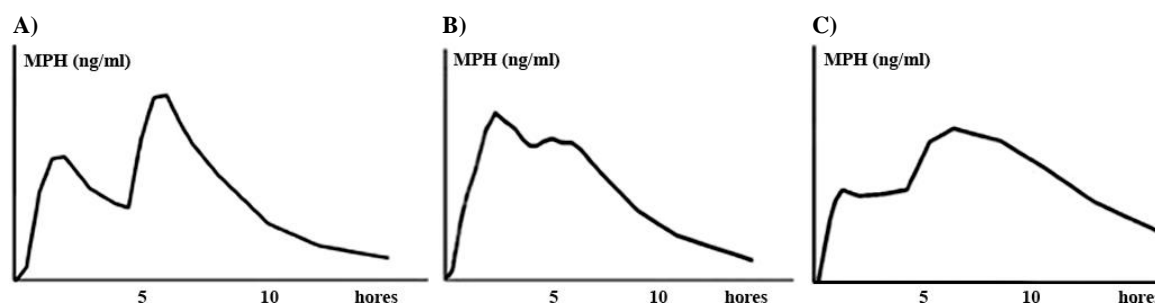


Figura 7. Corbes farmacocinètiques corresponents a les preparacions de MPH d'alliberació A) immediata (p. e., Rubifen®); B) intermèdia (p. e., Medikinet®); C) prolongada (p. e., Concerta®) (adaptació de Banaschewski et al., 2006).

2.3. Tractament amb MPH i avaluació de la resposta terapèutica

Donada l'elevada variabilitat interindividual en la resposta i tolerabilitat a la medicació psicoestimulant, el tractament actual s'estableix de forma empírica per mitjà d'una estratègia d'assaig-error basada en la titulació gradual de la dosi de fàrmac. En el cas del MPH, es recomana iniciar la teràpia amb una dosi de 5 mg, administrada tres cops al dia, i incrementar-la setmanalment de forma progressiva fins a assolir el control òptim dels símptomes o fins a

l'aparició d'efectes adversos significatius (Greenhill, Pliszka et al., 2002). Convé, tanmateix, no superar la dosi total diària de 60 mg (o 72 mg per a les formulacions d'alliberació prolongada) (Greenhill, Pliszka et al., 2002; Stevens, Wilens i Stern, 2013). Si, un cop assolida la dosi màxima, el pacient no mostra una resposta clínica adequada o experimenta reaccions adverses al MPH, s'aconsella optar per una medicació o estratègia alternativa (Coghill i Seth, 2015).

Així doncs, l'avaluació periòdica de l'eficàcia terapèutica i la tolerabilitat resulta fonamental per a la correcta administració del fàrmac. No obstant això, no existeix una decisió consensuada pel que fa a la forma de valorar la resposta i els efectes adversos al tractament. Tradicionalment, s'ha considerat que els canvis en la simptomatologia induïts per la medicació constitueixen una unitat de mesura vàlida (Adamo, Seth i Coghill, 2015; Rostain, Jensen, Connor, Miesle i Faraone, 2015). En aquest sentit, molts estudis han avaluat les diferències en les puntuacions obtingudes, abans i després del tractament, en escales com l'ADHD-RS o la SNAP-IV (de l'anglès *ADHD Rating Scale* i *Swanson, Nolan and Pelham, version IV*, respectivament), tot i que amb criteris molt diversos (p. e., puntuació total a l'ADHD-RS ≤ 18 , puntuació mitjana o puntuació en cadascun dels ítems de la SNAP-IV ≤ 1 , reducció respecte a la puntuació basal $\geq 25\%$ o 30%) (Rostain et al., 2015; Steele, Jensen i Quinn, 2006). Ara bé, aquestes escales són completades, en el cas dels infants, pels pares o mestres, fet que representa una font de biaix important, i resulten, conseqüentment, poc fiables. Per aquest motiu, les directrius actuals aconsellen l'administració d'escales com la CGI-S (de l'anglès *Clinical Global Impression-Severity*) per part de psiquiatres experimentats, tenint en compte múltiples informants (pares, mestres i pacient, sempre que sigui possible) (Adamo et al., 2015).

No obstant això, la definició de la resposta en termes de reducció simptomatològica no té en compte la gravetat inicial del trastorn, de manera que el grup d'individus classificats com a responedors pot incloure pacients amb dèficits significatius en diferents aspectes del funcionament diari (Steele et al., 2006). En conseqüència, s'ha proposat la utilització complementària d'escales com la CGI-I (de l'anglès *Clinical Global Impression-Improvement*) o la CGAS (de l'anglès *Children's Global Assessment Scale*), que proporcionen una mesura general del grau de deteriorament funcional, i d'altres com la WFIRS-P (de l'anglès *Weiss Functional Impairment Rating Scale-Parent Report*), que avaluen específicament els dèficits relacionats amb el TDAH (Adamo et al., 2015).

Pel que fa a la monitorització de la seguretat, els mètodes disponibles també varien considerablement, tal i com constataren Greenhill i els seus col·laboradors (Greenhill et al.,

2003). La majoria d'assajos clínics han basat la recollida de dades en informes emesos de manera espontània per part dels pacients sobre els efectes adversos més comuns o seriosos, amb el consegüent risc d'obviar-ne d'altres de rellevants (Adamo et al., 2015). Altres investigacions han inclòs paràmetres hematològics i cardiovasculars com a mesures de seguretat. En aquest sentit, és habitual que en la pràctica clínica es registri periòdicament la pressió arterial i la freqüència cardíaca, així com el pes i l'alçada, amb l'objectiu de detectar possibles casos d'hipertensió, taquicàrdia o retard en el creixement induïts per la medicació (Feldman i Reiff, 2014; Graham et al., 2011). Per altra banda, s'han començat a utilitzar escales d'avaluació estructurades com la BPRS (de l'anglès *Brief Psychiatric Rating Scale*) o la SAFTEE (Levine i Schooler, 1986), malgrat que aquesta última no resulta adequada per a la pràctica clínica rutinària donada la seva llargada de vuitanta ítems. Com a alternativa, existeix una versió més curta, anomenada SERS (de l'anglès *Stimulant Side Effects Rating Scale*; Barkley, McMurray, Edelbrock i Robbins, 1990), que permet avaluar a través de disset ítems puntuats del 0 al 9 (on 0 correspon a 'absència d'efectes adversos' i 9 a 'efecte advers molt seriós o freqüent') els efectes adversos més comunament associats al tractament psicoestimulant del TDAH, com ara l'insomni, la pèrdua d'apetit, les cefalees i dolors abdominals o la irritabilitat (Figura 8).

Nom _____ Data _____
 Persona que completa el formulari _____

Instruccions

Si us plau, puntuï cada comportament amb un valor de 0 (absent) a 9 (seriós). Encercli només un número dels que apareixen al costat de cada ítem. Un zero significa que no ha observat el comportament en l'infant durant la setmana passada, i un 9 significa que sí que l'ha apreciat i que creu que, o bé és molt seriós o ocorre amb molta freqüència.

Comportament	Absent										Seriós									
Insomni o dificultats per dormir	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Malsons	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Mira molt o somia despert	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Parla menys amb els altres	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Desinteressat en els altres	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Disminució de l'apetit	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Irritable	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Dolors abdominals	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Cefalees	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Somnolència	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Trist/infeliç	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Propens a plorar	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ansiós	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Es mossega les ungles	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Eufòric/inusualment feliç	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Mareig	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tics o moviments nerviosos	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Figura 8. Escala d'avaluació dels efectes adversos a la medicació estimulante (adaptació de Barkley et al., 1990).

2.4. Estudis farmacogenètics sobre l'eficàcia del MPH

2.4.1. Estudis d'associació basats en gens candidats

2.4.1.1. Gens relacionats amb la farmacodinàmica

Sistema de neurotransmissors

Sistema dopaminèrgic

La teoria dopaminèrgica, proposada per Levy l'any 1991, atribueix els símptomes del TDAH a un dèficit de dopamina en regions específiques del cervell, com les àrees frontals i estriatals, encarregades de l'atenció, la planificació, l'organització, la memòria i el control dels moviments (Levy, 1991). La medicació estimulants, que com s'ha comentat actua sobre aquest sistema de neurotransmissió, destaca per la seva eficàcia i rapidesa en la reducció de les manifestacions del trastorn i reforça, juntament amb evidències provinents de models animals, estudis genètics i de neuroimatge, la implicació de la via dopaminèrgica en la fisiopatologia del TDAH (Genro, Kieling, Rohde i Hutz, 2010). Precisament, en base a aquest presumpte mecanisme d'acció, la recerca farmacogenètica del MPH s'ha centrat de forma molt majoritària en el gen que codifica la principal diana del fàrmac, el transportador de dopamina, que conté a la regió 3' no codificant un VNTR funcional de 40 pb amb repeticions de 3-11 còpies. Ara bé, malgrat la plausibilitat de *SLC6A3* com a candidat a modular els efectes terapèutics del MPH, els resultats obtinguts són conflictius i no permeten establir conclusions definitives (Taula 7). En aquest sentit, els estudis realitzats fins ara en pacients amb TDAH han descrit una resposta desfavorable al MPH, tant en individus homozigots per a l'al·lel 9R (Jooper et al., 2007; Kirley et al., 2003; Stein et al., 2014; Stein et al., 2005) com per a l'al·lel 10R (Froehlich et al., 2011; Kooij et al., 2008; Purper-Ouakil et al., 2008; Roman et al., 2002; Winsberg i Comings, 1999), a més de nombroses associacions no significatives (Cheon, Ryu, Kim i Cho, 2005; Contini et al., 2010; Gomez-Sanchez et al., 2017; Hegvik, Jacobsen, Fredriksen, Zayats i Haavik, 2016; Hong et al., 2012; Kereszturi et al., 2008; Langley, Turic et al., 2005; McGough et al., 2006; McGough et al., 2009; Mick, Biederman, Spencer, Faraone i Sklar, 2006; Tharoor, Lobos, Todd i Reiersen, 2008; van der Meulen et al., 2005; Zeni et al., 2007). Malgrat aquesta heterogeneïtat, una meta-anàlisi recent sobre els efectes de l'al·lel 10R, realitzada a partir de setze estudis en pacients infantils, confirma que els nens amb el genotip 10/10 presenten un major risc de

resistència al tractament (Myer, Boland i Faraone, 2017), resultats que coincideixen parcialment amb els d'una meta-anàlisi anterior en què la presència de l'al·lel 10R en homozigosi es trobà associada a una millora menys significativa dels símptomes si es tenien en compte únicament les dades dels assajos naturalístics inclosos (Kambeitz, Romanos i Ettinger, 2014).

Un altre dels candidats àmpliament investigats és el receptor dopaminèrgic D4, que regula la síntesi i alliberament de dopamina (Heckers i Konradi, 2003), i s'expressa de forma abundant en regions cerebrals implicades en l'atenció, la memòria, el processament del llenguatge i la inhibició (Noaín et al., 2006). La majoria d'estudis farmacogenètics realitzats fins ara han avaluat el VNTR de 48 pb situat al tercer exó del gen *DRD4* (Taula 7). L'al·lel de set repeticions (7R) és, juntament amb el 4R i el 2R, un dels més freqüents a la població general (Chang, Kidd, Livak, Pakstis i Kidd, 1996) i presenta una resposta disminuïda a la dopamina (Asghari et al., 1995), fet que resulta consistent amb les observacions de Hamarman i els seus col·laboradors, els quals demostraren que els portadors de l'al·lel 7R requerien dosis de MPH més elevades per a la millora i normalització dels símptomes de TDAH (Hamarman, Fossella, Ulger, Brimacombe i Dermody, 2004). De forma similar, diversos estudis posteriors identificaren una associació positiva entre la presència de l'al·lel 4R i la resposta terapèutica en nens amb el trastorn (Cheon, Kim i Cho, 2007; Froehlich et al., 2011; McGough et al., 2006; McGough et al., 2009). Tahir et al., per contra, investigaren una mostra constituïda per pacients infantils tractats amb MPH i els seus pares biològics, i mostraren, que l'al·lel 7R era més freqüentment transmès entre els individus responedors (Tahir et al., 2000). Més recentment, Naumova i els seus col·laboradors han observat que la presència de l'al·lel 7R en homozigosi determina una resposta més favorable al tractament (Naumova, Grizenko, Sengupta i Joobar, 2017). A més d'aquests resultats conflictius, convé destacar que onze dels divuit estudis actualment publicats han fracassat a l'hora d'identificar associacions significatives entre el VNTR de 48 pb a *DRD4* i els efectes del MPH, tant en poblacions infantils (Gomez-Sanchez et al., 2017; Hong et al., 2012; Ji, Paik, Park i Lim, 2013; Kereszturi et al., 2008; Tharoor et al., 2008; van der Meulen et al., 2005; Winsberg i Comings, 1999; Zeni et al., 2007) com adults (Contini et al., 2012; Hegvik et al., 2016; Kooij et al., 2008). No obstant això, un segon polimorfisme, consistent en una duplicació de 120 pb a la regió promotora del gen, ha aportat resultats més prometedors (Gomez-Sanchez et al., 2017; McGough et al., 2006; McGough et al., 2009).

Pel que fa a la resta de receptors dopaminèrgics, les dades disponibles sobre l'impacte de la variabilitat genètica en la resposta al MPH són molt escasses (Taula 7).

Taula 7. Estudis farmacogenètics sobre l'eficàcia del MPH amb candidats del sistema dopaminèrgic

Gen	Polimorfisme	Referència	Disseny de l'estudi	Mostra	Població	Dosi diària	Durada	Instrument d'avaluació	Definició de la resposta	Resultats
<i>SLC6A3</i>	VNTR 40 pb	Winsberg i Comings, 1999	Obert, prospectiu	30 nens amb TDAH	Afroamericana	No > 60 mg o 0,7 mg/kg	N/A ^a	ABR5	Puntuacions a ABR5 ≤1	Associació entre genotip 10/10 i mala resposta
<i>SLC6A3</i>	VNTR 40 pb	Roman et al., 2002	Naturalístic	50 nois i adolescents amb TDAH	Brasilera (origen europeu)	0,3-0,7 mg/kg	30 dies	ABRS; CGAS	Reducció de les puntuacions basals a ABR5 ≥50%. Canvis en les puntuacions a CGAS; Reducció de les puntuacions basals a CGAS ≥50%	Associació entre genotip 10/10 i mala resposta
<i>SLC6A3</i>	VNTR 40 pb	Kirley et al., 2003	Naturalístic, retrospectiu	119 nens amb TDAH i les seves famílies	Caucàsica (Irlanda)	N/A	N/A	Escala de tres ítems; CPRS-R:L	'molt bona', 'mediocre', 'no resposta'; Canvis en les puntuacions normatives a CPRS-R:L	Associació entre genotip 9/9 i mala resposta
<i>SLC6A3</i>	VNTR 40 pb	Cheon et al., 2005	Naturalístic	11 nens amb TDAH	Coreana	0,3-0,7 mg/kg	8 setmanes	ADHD-RS	Reducció de la puntuació total a ADHD-RS ≥50%	No associació
<i>SLC6A3</i>	VNTR 40 pb -4548 A>G -4529 T>C -4450 C>G	Langley, Turic et al., 2005	Naturalístic, retrospectiu	168 nens i adolescents amb TDAH	Caucàsica (Regne Unit)	N/A	≥3 mesos	CGI-I	Puntuació a CGI-I ≤2	No associació No associació No associació No associació
<i>SLC6A3</i>	VNTR 40 pb	Stein et al., 2005	Aleatoritzat, doble cec, intrasubjecte, controlat amb placebo	47 nens i adolescents amb TDAH	Caucàsica, afroamericana, hispana, altres	18, 36, 54 mg de MPH o placebo	4 setmanes	ADHD-RS; CGI-S	Canvis en les puntuacions a ADHD-RS; Puntuació a CGI-S ≤3	Associació entre genotip 9/9 i mala resposta
<i>SLC6A3</i>	VNTR 40 pb	van der Meulen et al., 2005	Obert, prospectiu	82 parelles de germans amb TDAH	Caucàsica (Holanda)	0,3-0,6 mg/kg	N/A	SWAN	Canvis en la puntuació total a SWAN	No associació
<i>SLC6A3</i>	VNTR 40 pb	McGough et al., 2006	Aleatoritzat, doble cec, intrasubjecte, controlat amb placebo	81 nens amb TDAH	Blanca, negra/afroamericana, hispana/latina, altres	3,75, 7,5, 15, 22,5 mg de MPH o placebo	5 setmanes	SKAMP; CLAM	Mesura combinada a partir de les puntuacions de pares i mestre a CLAM/SKAMP; Puntuacions separades de pares i mestre a CLAM/SKAMP	No associació
<i>SLC6A3</i>	VNTR 40 pb	Mick et al., 2006	Aleatoritzat, doble cec, controlat amb placebo	106 adults amb TDAH	Americana	0,5, 0,75, 1,0, 1,3 mg/kg de MPH o placebo	5 o 6 setmanes	CGI-I; AISRS	Puntuació a CGI-I ≤1 i reducció de les puntuacions a AISRS >30%	No associació
<i>SLC6A3</i>	VNTR 40 pb	Joobert et al., 2007	Aleatoritzat, doble cec, intrasubjecte, controlat amb placebo	151 nens amb TDAH	Caucàsica i no caucàsica	0,5 mg/kg de MPH o placebo	2 setmanes	CGI-P; CGI-T	Canvis en les puntuacions a CGI-P o CGI-T	Associació entre genotip 9/9 i mala resposta

Taula 7. Continuació

Gen	Polimorfisme	Referència	Disseny de l'estudi	Mostra	Població	Dosi diària	Durada	Instrument d'avaluació	Definició de la resposta	Resultats
<i>SLC6A3</i>	VNTR 40 pb	Zeni et al., 2007	Naturalístic	111 nens i adolescents amb TDAH	Brasilera (origen europeu)	0,5 mg/kg	30 dies	SNAP-IV; CGAS	Canvis en les puntuacions a SNAP-IV i CGAS	No associació
<i>SLC6A3</i>	VNTR 40 pb	Kereszturi et al., 2008	Obert, prospectiu	122 nens amb TDAH	Caucàsica (Hongria)	0,22-0,95 mg/kg (0,55±0,15 mg/kg)	6 mesos	ADHD-RS; CGI-S	Reducció de la puntuació total a ADHD-RS $\geq 25\%$ i puntuació a CGI-S ≤ 2 ; Canvis en les puntuacions a ADHD-RS i CGI-S	No associació
<i>SLC6A3</i>	VNTR 40 pb	Kooij et al., 2008	Aleatoritzat, doble cec, intrasubjecte, controlat amb placebo	42 adults amb TDAH	Caucàsica	0,5, 0,75 o 1,0 mg/kg de MPH o placebo	3 setmanes	ADHD-RS; CGI-S	Reducció de ≥ 2 punts a CGI-S i reducció de les puntuacions a ADHD-RS $\geq 30\%$; Reducció de ≥ 2 punts a CGI-S o reducció de les puntuacions a ADHD-RS $\geq 30\%$	Associació entre genotip 10/10 i mala resposta
<i>SLC6A3</i>	VNTR 40 pb	Purper-Ouakil et al., 2008	Naturalístic	141 nens i adolescents amb TDAH	Caucàsica (França)	N/A	N/A	CGI-S; ADHD-RS	Reducció de ≥ 2 punts a CGI-S; Reducció de les puntuacions a ADHD-RS $\geq 40\%$	Associació entre genotip 10/10 i mala resposta
<i>SLC6A3</i>	VNTR 40 pb	Tharoor et al., 2008	Naturalístic, retrospectiu	156 bessons tractats amb MPH per als símptomes de TDAH	Americana	N/A	N/A	MAGIC	Informe patern (sí/no) sobre la millora dels símptomes de TDAH	No associació
<i>SLC6A3</i>	VNTR 40 pb	McGough et al., 2009	Aleatoritzat, doble cec, intrasubjecte, controlat amb placebo	79 nens i adolescents amb TDAH	No hispana blanca, hispana blanca, negra, asiàtica, altres	<25 kg: 15, 30, 45 mg de MPH o placebo; ≥ 25 kg: dosi addicional 60 mg	4 o 5 setmanes	ADHD-RS; SWAN	PCA: dos components (síntomes de TDAH i correcció de problemes matemàtics) derivats de sis mesures d'eficàcia	No associació
<i>SLC6A3</i>	VNTR 30 pb	Contini et al., 2010	Naturalístic	171 adults amb TDAH	Brasilera (origen europeu)	0,48±0,17 mg/kg	30 dies	SNAP-IV; CGI-S	Reducció de les puntuacions a SNAP-IV $\geq 30\%$ i puntuació a CGI-S ≤ 2 ; Canvis en les puntuacions a SNAP-IV	No associació
<i>SLC6A3</i>	VNTR 40 pb	Froehlich et al., 2011	Aleatoritzat, doble cec, intrasubjecte, controlat amb placebo	89 nens amb TDAH	Blanca, negra, hispana/latina, altres	≤ 25 kg: 18, 27, 36 mg de MPH o placebo; >25 kg: 18, 36, 54 mg de MPH o placebo	4 setmanes	VADPRS; VADTRS	Canvis en les puntuacions a VADPRS i VADTRS	Associació entre al·lel 10R i mala resposta

Taula 7. Continuació

Gen	Polimorfisme	Referència	Disseny de l'estudi	Mostra	Població	Dosi diària	Durada	Instrument d'avaluació	Definició de la resposta	Resultats
<i>SLC6A3</i>	VNTR 40 pb	Hong et al., 2012	Obert, prospectiu	103 nens i adolescents amb TDAH	Coreana	19,8±8,2 mg (basal); 29,1±11,6 mg (setmana 8)	8 setmanes	ADHD-RS; CGI-I	Reducció de la puntuació total a ADHD-RS ≥50% i puntuació a CGI-I ≤2	No associació
<i>SLC6A3</i>	VNTR 40 pb	Stein et al., 2014	Aleatoritzat, doble cec, intrasubjecte, controlat amb placebo	56 nens i adolescents amb TDAH	Afroamericana, caucàsica, llatina, biracial, asiàtica i nadiua americana	10, 20, 25-30 mg de MPH o placebo; <35 kg; dosi màxima 25 mg	8 setmanes	ADHD-RS	Canvis en les puntuacions a ADHD-RS	Associació entre genotip 9/9 i mala resposta
<i>SLC6A3</i>	rs2963238	Hegvik et al., 2016	Naturalístic	564 adults amb TDAH	Caucàsica	N/A	N/A	Questionari 1: resposta 'molt bona', 'bona', 'efecte però mala tolerància' i 'no efecte o dubtós'; Questionari 2: s'omet opció 'efecte però mala tolerància'	Tres primeres categories del questionari 1 o dues primeres del questionari 2	No associació
	-839 C>T									No associació
<i>SLC6A3</i>	VNTR 40 pb									No associació
<i>SLC6A3</i>	VNTR 30 pb	Gomez-Sanchez et al., 2017	Obert, prospectiu	208 nens i adolescents amb TDAH	Caucàsica (Espanya)	35,5±15 mg (basal); 39,5±15,7 mg (mes 3); 39,4±15,8 mg (mes 6); 40,5±15,5 mg (mes 12)	12 mesos	CGI-S; CGAS	Canvis en les puntuacions a CGI-S i CGAS	No associació Interacció resposta x temps No associació Associació amb millora simptomatològica No associació
<i>DRD4</i>	VNTR 48 pb	Winsberg i Comings, 1999	Obert, prospectiu	30 nens amb TDAH	Afroamericana	No > 60 mg o 0,7 mg/kg	N/A	ABRS	Puntuacions a ABRS ≤1	No associació
<i>DRD4</i>	VNTR 48 pb	Tahir et al., 2000	Obert, prospectiu	100 nens amb TDAH i els seus pares biològics	Turca	≥0,3 mg/kg	12 setmanes	Llistat d'items del DSM-IV; CGI-P; CGI-T; CBCL; TRF	Reducció del número de símptomes ≥50%	Associació entre al·lel 7R i resposta favorable
<i>DRD4</i>	VNTR 48 pb	Hamerman et al., 2004	Obert, prospectiu	45 nens i adolescents amb TDAH	Afroamericana, hispana	Augments de 5 mg fins a normalitzar símptomes o fracàs terapèutic (dosi màxima 60 mg)	N/A	CGI-P	Dosis requerides per assolir una millora de 10 punts i la normalització (puntuació T, 60)	Associació entre al·lel 7R i dosis requerides més elevades

Taula 7. Continuació

Gen	Polimorfisme	Referència	Disseny de l'estudi	Mostra	Població	Dosi diària	Durada	Instrument d'avaluació	Definició de la resposta	Resultats
<i>DRD4</i>	VNTR 48 pb	van der Meulen et al., 2005	Obert, prospectiu	82 parelles de germans amb TDAH	Caucàsica (Holanda)	0,3-0,6 mg/kg	N/A	SWAN	Canvis en la puntuació total a SWAN	No associació
<i>DRD4</i>	VNTR 48 pb Indel 120 pb en tàndem	McGough et al., 2006	Aleatoritzat, doble cec, intrasubjecte, controlat amb placebo	81 nens amb TDAH	Blanca, negra/afroamericana, hispana/latina, altres	3,75, 7,5, 15, 22,5 mg de MPH o placebo	5 setmanes	SKAMP; CLAM	Mesura combinada a partir de les puntuacions de pares i mestre a CLAM/SKAMP; Puntuacions separades de pares i mestre a CLAM/SKAMP	Associació entre genotip 4/4 i resposta favorable No associació
<i>DRD4</i>	VNTR 48 pb	Cheon et al., 2007	Naturalístic	83 nens amb TDAH	Coreana	N/A	8 setmanes	ADHD-RS	Reducció de les puntuacions a ADHD-RS $\geq 50\%$	Associació entre genotip 4/4 i resposta favorable
<i>DRD4</i>	VNTR 48 pb	Zeni et al., 2007	Naturalístic	111 nens i adolescents amb TDAH	Brasilera (origen europeu)	0,5 mg/kg	30 dies	SNAP-IV; CGAS	Canvis en les puntuacions a SNAP-IV i CGAS	No associació
<i>DRD4</i>	VNTR 48 pb	Kereszturi et al., 2008	Obert, prospectiu	122 nens amb TDAH	Caucàsica (Hongria)	0,22-0,95 mg/kg (0,55 \pm 0,15 mg/kg)	6 mesos	ADHD-RS; CGI-S	Reducció de la puntuació total a ADHD-RS $\geq 25\%$ i puntuació a CGI-S ≤ 2 ; Canvis en les puntuacions a ADHD-RS i CGI-S	No associació
<i>DRD4</i>	VNTR 48 pb Indel 120 pb en tàndem	Kooij et al., 2008	Aleatoritzat, doble cec, intrasubjecte, controlat amb placebo	42 adults amb TDAH	Caucàsica	0,5, 0,75 o 1,0 mg/kg de MPH o placebo	3 setmanes	ADHD-RS; CGI-S	Reducció de ≥ 2 punts a CGI-S i reducció de les puntuacions a ADHD-RS $\geq 30\%$; Reducció de ≥ 2 punts a CGI-S o reducció de les puntuacions a ADHD-RS $\geq 30\%$	No associació No associació
<i>DRD4</i>	VNTR 48 pb	Tharoor et al., 2008	Naturalístic, retrospectiu	159 bessons triats amb MPH per als símptomes de TDAH	Americana	N/A	N/A	MAGIC	Informe patèrn (sí/no) sobre la millora dels símptomes de TDAH	No associació
<i>DRD4</i>	VNTR 48 pb Indel 120 pb en tàndem	McGough et al., 2009	Aleatoritzat, doble cec, intrasubjecte, controlat amb placebo	81 nens i adolescents amb TDAH	No hispana blanca, hispana blanca, negra, asiàtica, altres	<25 kg: 15, 30, 45 mg de MPH o placebo; ≥ 25 kg: dosi addicional 60 mg	4 o 5 setmanes	ADHD-RS; SWAN	PCA: dos components (símptomes de TDAH i correcció de problemes matemàtics) derivats de sis mesures d'eficàcia	Associació entre al·lel 4R i resposta favorable Associació entre al·lel 240 pb i resposta favorable

Taula 7. Continuació

Gen	Polimorfisme	Referència	Disseny de l'estudi	Mostra	Població	Dosi diària	Durada	Instrument d'avaluació	Definició de la resposta	Resultats
<i>DRD4</i>	VNTR 48 pb	Froehlich et al., 2011	Al·lelitzat, doble cec, intrasubjecte, controlat amb placebo	89 nens amb TDAH	Blanca, negra, hispana/latina, altres	≤5 kg: 18, 27, 36 mg de MPH o placebo; >25 kg: 18, 36, 54 mg de MPH o placebo	4 setmanes	VADPRS; VADTRS	Canvis en les puntuacions a VADPRS i VADTRS	Associació entre al·lel 4R i resposta favorable
<i>DRD4</i>	VNTR 48 pb	Confini et al., 2012	Naturalístic	164 adults amb TDAH	Brasilera (origen europeu)	≥0,3 mg/kg	30 dies	SNAP-IV; CGI-S	Reducció de les puntuacions a SNAP-IV ≥30% i puntuació a CGI-S ≤2; Canvis en les puntuacions a SNAP-IV	No associació
<i>DRD4</i>	VNTR 48 pb	Hong et al., 2012	Obert, prospectiu	103 nens i adolescents amb TDAH	Coreana	19,8±8,2 mg (basal); 29,1±11,6 mg (setmana 8)	8 setmanes	ADHD-RS; CGI-I	Reducció de la puntuació total a ADHD-RS ≥50% i puntuació a CGI-I ≤2	No associació
<i>DRD4</i>	VNTR 48 pb	Ji et al., 2013	Naturalístic	114 nens i adolescents amb TDAH	Coreana	Augments setmanals de 9 mg des de 18 mg fins a un màxim de 36 mg	8 setmanes	ADHD-RS; CGI-S; CGI-I	Canvis en les puntuacions a ADHD-RS i CGI-S; Puntuació a CGI-I a la setmana 8	No associació
<i>DRD4</i>	VNTR 48 pb	Hegvik et al., 2016	Naturalístic	564 adults amb TDAH	Caucàsica	N/A	N/A	Qüestionari 1: resposta 'molt bona', 'bona', 'efecte però mala tolerància' i 'no efecte o dubtós'; Qüestionari 2: s'omet opció 'efecte però mala tolerància'	Tres primeres categories del qüestionari 1 o dues primeres del qüestionari 2	No associació
<i>DRD4</i>	VNTR 48 pb Indel 120 pb en tàndem rs3758653	Gomez-Sanchez et al., 2017	Obert, prospectiu	208 nens i adolescents amb TDAH	Caucàsica (Espanya)	35,5±15 mg (basal); 39,5±15,7 mg (mes 3); 39,4±15,8 mg (mes 6); 40,5±15,5 mg (mes 12)	12 mesos	CGI-S; CGAS	Canvis en les puntuacions a CGI-S i CGAS	No associació Associació amb resposta No associació
<i>DRD4</i>	VNTR 48 pb	Naumova et al., 2017	Al·lelitzat, doble cec, intrasubjecte, controlat amb placebo	374 nens amb TDAH	Caucàsica i no caucàsica	0,5 mg/kg de MPH o placebo	2 setmanes	CGI-P; CGI-T	Canvis en les puntuacions a CGI-P o CGI-T	Associació entre genotip 7/7 i resposta favorable
<i>DRD2</i>	Taq IA (rs 1800497)	Winsberg i Comings, 1999	Obert, prospectiu	30 nens amb TDAH	Afroamericana	No > 60 mg o 0,7 mg/kg	N/A	ABRS	Puntuacions a ABRS ≤1	No associació

Taula 7. Continuació

Gen	Polimorfisme	Referència	Disseny de l'estudi	Mostra	Població	Dosi diària	Durada	Instrument d'avaluació	Definició de la resposta	Resultats
<i>DRD2</i>	Taq IA (rs1800497)	Gomez-Sanchez et al., 2017	Obert, prospectiu	208 nens i adolescents amb TDAH	Caucàsica (Espanya)	35,5±15 mg (basal); 39,5±15,7 mg (mes 3); 39,4±15,8 mg (mes 6); 40,5±15,5 mg (mes 12)	12 mesos	CGI-S; CGAS	Canvis en les puntuacions a CGI-S i CGAS	Interacció resposta x temps
<i>DRD5</i>	Repetició (CT) _n	Tahir et al., 2000	Obert, prospectiu	100 nens amb TDAH i els seus pares biològics	Turca	≥0,3 mg/kg	12 setmanes	Llistat d'ítems del DSM-IV; CGI-P; CGI-T; CBCL; TRF	Reducció del número de símptomes ≥50%	Associació entre al·lel 151 pb i resposta favorable
<i>DRD5</i>	Repetició (CT) _n	Hegvik et al., 2016	Naturalístic	564 adults amb TDAH	Caucàsica	N/A	N/A	<p>Qüestionari 1: resposta 'molt bona', 'bona', 'efecte però mala tolerància' i 'no efecte o dubtós';</p> <p>Qüestionari 2: 'omet opció' 'efecte però mala tolerància'</p>	Tres primeres categories del qüestionari 1 o dues primeres del qüestionari 2	No associació

Nota: VNTR, nombre variable de repeticions en tàndem; ABRIS, de l'anglès *Conners' Abbreviated Rating Scale*; CGAS, de l'anglès *Children's Global Assessment Scale*; CPRS-R-L, de l'anglès *Conners' Parent Rating Scale-Revised: Long version*; ADHD-RS, de l'anglès *ADHD Rating Scale*; CGI-I, de l'anglès *Clinical Global Impression-Improvement*; CGI-S, de l'anglès *Clinical Global Impression-Severity*; SWAN, de l'anglès *Strengths and Weaknesses of ADHD symptoms and Normal behaviors*; SKAMP, de l'anglès *Swanson, Kotkin, Agler, M-Flynn and Pelham*; CLAM, de l'anglès *Conners, Loney and Milich*; AISRS, de l'anglès *Adult ADHD Investigator System Report Scale*; CGI-P, de l'anglès *Conners' Global Index-Parentis*; CGI-T, de l'anglès *Conners' Global Index-Teacher*; SNAP-IV, de l'anglès *Swanson, Nolan and Pelham, version IV*; MAGIC, de l'anglès *Missouri Assessment for Genetics Interview for Children*; PCA, anàlisi de components principals (de l'anglès *Principal component analysis*); VADPRS, de l'anglès *Vanderbilt ADHD Diagnostic Parent Rating Scale*; VADTRS, de l'anglès *Vanderbilt ADHD Diagnostic Teacher Rating Scale*; CBCL, de l'anglès *Child Behavior Checklist*; TRF, de l'anglès *Teacher's Report Form*; indel, inserció/delecció.

^a N/A indica que la informació no s'especifica.

Sistema noradrenèrgic

El sistema noradrenèrgic està implicat en la regulació de funcions rellevants per al TDAH com la memòria de treball, l'atenció, la planificació i el control inhibitori del comportament (Arnsten, 2007). A més, tal i com s'ha comentat, el MPH no només inhibeix la recaptació de dopamina, sinó que també actua sobre el transportador de noradrenalina, motiu pel qual el gen *SLC6A2* representa un candidat raonable per als estudis farmacogenètics. No obstant això, la majoria d'investigacions dirigides a avaluar la possible associació entre l'eficàcia del fàrmac i variants genètiques a *SLC6A2* (principalment, els polimorfismes G1287A i -3081 A/T) han resultat infructuoses (Gomez-Sanchez et al., 2017; Hegvik et al., 2016; Hong et al., 2012; Kim et al., 2011; Kooij et al., 2008; Lee et al., 2011; McGough et al., 2009) (Taula 8). Per contra, els estudis en què s'han obtingut resultats positius coincideixen a assenyalar que la presència de l'al·lel G a G1287A (rs5569) afavoreix la resposta al MPH (Park et al., 2012; Song, Song, Jhung i Cheon, 2011; Yang, Wang, Li i Faraone, 2004). Per altra banda, l'al·lel T de la variant -3081 A/T (rs28386840) s'ha trobat associat de forma reiterada a una millora dels símptomes, especialment hiperactius/impulsius, després del tractament amb MPH (Angyal et al., 2018; Kim et al., 2010).

A part de *SLC6A2*, es considera que el gen del receptor adrenèrgic α_{2A} també podria modular els efectes terapèutics del MPH, atès que l'administració d'antagonistes dels receptors α_2 reverteix les accions induïdes pel fàrmac (Andrews i Lavin, 2006; Arnsten i Dudley, 2005). Els primers estudis farmacogenètics, centrats exclusivament en avaluar el rol del polimorfisme funcional -1291 C>G (rs1800544), contribuïren a reforçar aquesta hipòtesi i aportaren evidències consistents sobre l'efecte de l'al·lel G en la millora dels símptomes, especialment, d'inatenció, durant el tractament amb MPH (Cheon, Cho, Koo, Song i Namkoong, 2009; da Silva et al., 2008; Polanczyk, Zeni et al., 2007) (Taula 8). A través d'un assaig clínic aleatoritzat, doble cec, intrasubjecte, controlat amb placebo, Froehlich et al. també detectaren un efecte principal de la variant -1291 C>G en la resposta al MPH, malgrat que en aquest cas l'al·lel G es mostrà associat a una prevalença superior de símptomes hiperactius/impulsius, tant durant el tractament amb placebo com amb les múltiples dosis de fàrmac administrades (Froehlich et al., 2011). Aquest optimisme inicial, tanmateix, ha donat pas a resultats predominantment negatius (Contini et al., 2011; Gomez-Sanchez et al., 2017; Hong et al., 2012; Kim et al., 2011), amb dues excepcions recents (Hegvik et al., 2016; Huang et al., 2018).

Taula 8. Estudis farmacogenètics sobre l'eficàcia del MPH amb candidats del sistema noradrenèrgic

Gen	Polimorfisme	Referència	Disseny de l'estudi	Mostra	Població	Dosi diària	Durada	Instrument d'avaluació	Definició de la resposta	Resultats
<i>SLC6A2</i>	G1287A (rs5569)	Yang et al., 2004	Naturalístic	45 nens i adolescents amb TDAH	Xinesa	0,45-0,60 mg/kg	1 setmana	ADHD-RS	Canvis en les puntuacions a ADHD-RS	Associació entre al·lel G i resposta favorable
<i>SLC6A2</i>	Indel 4 pb (regió promotora)	Kooij et al., 2008	Aleatoritzat, doble cec, intrasubjecte, controlat amb placebo	42 adults amb TDAH	Caucàsica	0,5, 0,75 o 1,0 mg/kg de MPH o placebo	3 setmanes	ADHD-RS; CGI-S	Reducció de ≥ 2 punts a CGI-S i reducció de les puntuacions a ADHD-RS $\geq 30\%$; Reducció de ≥ 2 punts a CGI-S o reducció de les puntuacions a ADHD-RS $\geq 30\%$	No associació
<i>SLC6A2</i>	G1287A (rs5569)	McGough et al., 2009	Aleatoritzat, doble cec, intrasubjecte, controlat amb placebo	82 nens i adolescents amb TDAH	No hispana blanca, hispana blanca, negra, asiàtica, altres	<25 kg: 15, 30, 45 mg de MPH o placebo; ≥ 25 kg: dosi addicional 60 mg	4 o 5 setmanes	ADHD-RS; SWAN	PCA: dos components (síntomes de TDAH i correcció de problemes matemàtics) derivats de sis mesures d'eficàcia	No associació
<i>SLC6A2</i>	G1287A (rs5569) -3081 A/T (rs28386840)	Kim et al., 2010	Obert, prospectiu	112 nens i adolescents amb TDAH	Coreana	19,9 \pm 8,3 mg (basal); 29,2 \pm 11,6 mg (setmana 2)	8 setmanes	ADHD-RS; CGI-I	Puntuació a CGI-I ≤ 2 ; Canvis en les puntuacions a ADHD-RS	No associació Associació entre al·lel T i resposta favorable
<i>SLC6A2</i>	G1287A (rs5569) -3081 A/T (rs28386840)	Kim et al., 2011	Obert, prospectiu	102 nens amb TDAH	Coreana	0,24 \pm 0,3 mg/kg (basal); 0,98 \pm 0,5 mg/kg (setmana 12)	12 setmanes	ADHD-RS; CGI-S; CGI-I	Puntuació total a ADHD-RS ≤ 18 , puntuació a cada ítem de l'ADHD-RS ≤ 1 i puntuació a CGI-I ≤ 2 ; Reducció de les puntuacions a ADHD-RS $\geq 50\%$; Compliment de tots els criteris anteriors	No associació No associació
<i>SLC6A2</i>	G1287A (rs5569) rs2242446 rs1610905 rs5568 rs998424	Lee et al., 2011	Obert, prospectiu	112 nens i adolescents amb TDAH	Coreana	Dosi inicial de 18 mg i augment progressius fins a 27, 36 o 54 mg	8 setmanes	ADHD-RS; CGI-I	Reducció de la puntuació total a ADHD-RS $\geq 50\%$ i puntuació a CGI-I ≤ 2 ; Canvis en les puntuacions a ADHD-RS o CGI-I	No associació No associació No associació No associació No associació
<i>SLC6A2</i>	G1287A (rs5569)	Song et al., 2011	Obert, prospectiu	114 nens i adolescents amb TDAH	Coreana	N/A	8 setmanes	ADHD-RS; CGI-S	Reducció de les puntuacions a ADHD-RS $\geq 50\%$ o puntuació a CGI-S ≤ 2	Associació entre genotip G/G i resposta favorable

Taula 8. Continuació

Gen	Polimorfisme	Referència	Disseny de l'estudi	Mostra	Població	Dosi diària	Durada	Instrument d'avaluació	Definició de la resposta	Resultats
SLC6A2	G1287A (rs5569)	Hong et al., 2012	Obert, prospectiu	103 nens i adolescents amb TDAH	Coreana	19,8±8,2 mg (basal); 29,1±11,6 mg (setmana 8)	8 setmanes	ADHD-RS; CGI-I	Reducció de la puntuació total a ADHD-RS $\geq 50\%$ i puntuació a CGI-I ≤ 2	No associació
	-3081 A/T (rs28386840)									No associació
SLC6A2	G1287A (rs5569)	Park et al., 2012	Obert, prospectiu	37 nens amb TDAH	Coreana	0,4-1,5 mg/kg	8 setmanes	ADHD-RS; CGI-I	Canvis en les puntuacions a ADHD-RS o CGI-I	Associació entre genotip G/G i resposta favorable
	-3081 A/T (rs28386840)									No associació
SLC6A2	rs192303	Song et al., 2014	Obert, prospectiu	139 nens i adolescents amb TDAH	Coreana	31,0±9,2 mg (setmana 8)	8 setmanes	ADHD-RS; CGI-I	Reducció de les puntuacions a ADHD-RS $\geq 50\%$; Puntuació a CGI-I ≤ 2	Associació amb resposta
	rs3785143									No associació
SLC6A2	-3081 A/T (rs28386840)	Hegvik et al., 2016	Naturalístic	564 adults amb TDAH	Caucàsica	N/A	N/A	Qüestionari 1: resposta 'molt bona', 'bona', 'efecte però mala tolerància' i 'no efecte o dubiós'; Qüestionari 2: s'omet opció 'efecte però mala tolerància'	Tres primeres categories del qüestionari 1 o dues primeres del qüestionari 2	No associació
	rs192303									No associació
SLC6A2	G1287A (rs5569)	Gomez-Sanchez et al., 2017	Obert, prospectiu	208 nens i adolescents amb TDAH	Caucàsica (Espanya)	35,5±15 mg (basal); 39,5±15,7 mg (mes 3); 39,4±15,8 mg (mes 6); 40,5±15,5 mg (mes 12)	12 mesos	CGI-S; CGAS	Canvis en les puntuacions a CGI-S i CGAS	No associació
	-3081 A/T (rs28386840)									No associació
SLC6A2	G1287A (rs5569)	Angyal et al., 2018	Obert, prospectiu	122 nens i adolescents amb TDAH	Caucàsica (Hongria)	0,22-0,95 mg/kg	2 mesos	ADHD-RS	Reducció de la puntuació total a ADHD-RS $\geq 25\%$; Canvis en les puntuacions a ADHD-RS	No associació
	-3081 A/T (rs28386840)									Associació entre haplotip rs28386840T-rs2242446C-rs3785143T i resposta favorable
SLC6A2	rs2242446	Angyal et al., 2018	Obert, prospectiu	122 nens i adolescents amb TDAH	Caucàsica (Hongria)	0,22-0,95 mg/kg	2 mesos	ADHD-RS	Reducció de la puntuació total a ADHD-RS $\geq 25\%$; Canvis en les puntuacions a ADHD-RS	No associació
	rs3785143									No associació
SLC6A2	rs3785157	Angyal et al., 2018	Obert, prospectiu	122 nens i adolescents amb TDAH	Caucàsica (Hongria)	0,22-0,95 mg/kg	2 mesos	ADHD-RS	Reducció de la puntuació total a ADHD-RS $\geq 25\%$; Canvis en les puntuacions a ADHD-RS	No associació
	rs7194256									No associació

Taula 8. Continuació

Gen	Polimorfisme	Referència	Disseny de l'estudi	Mostra	Població	Dosi diària	Durada	Instrument d'avaluació	Definició de la resposta	Resultats
ADRA2A	-1291 C>G (rs1800544)	Polanczyk, Zeni et al., 2007	Naturalístic	106 nens i adolescents amb TDAH	Brasilera (origen europeu)	≥0,3 mg/kg	1 mes	SNAP-IV	Canvis en les puntuacions a SNAP-IV	Associació entre al·lel G i resposta favorable
ADRA2A	-1291 C>G (rs1800544)	da Silva et al., 2008	Naturalístic	59 nens i adolescents amb TDAH (inattent)	Brasilera (origen europeu)	0,63±0,18 mg/kg	1 mes	SNAP-IV	Canvis en les puntuacions a SNAP-IV	Associació entre al·lel G i resposta favorable
ADRA2A	-1291 C>G (rs1800544)	Cheon et al., 2009	Naturalístic	114 nens i adolescents amb TDAH	Coreana	N/A	8 setmanes	ADHD-RS; CGI-I	Reducció de la puntuació total a ADHD-RS ≥50% o puntuació a CGI-I ≤2; Canvis en la puntuació total a ADHD-RS	Associació entre genotip G/G i resposta favorable
ADRA2A	-1291 C>G (rs1800544) 1780 C>T (rs553668) -262 G>A (rs1800545)	Contini et al., 2011	Naturalístic	165 adults amb TDAH	Brasilera (origen europeu)	≥0,3 mg/kg	30 dies	SNAP-IV; CGI-S	Reducció de les puntuacions a SNAP-IV ≥30% i puntuació a CGI-S ≤2; Canvis en les puntuacions a SNAP-IV	No associació No associació No associació
ADRA2A	-1291 C>G (rs1800544)	Froehlich et al., 2011	Aleatoritzat, doble cec, intrasubjecte, controlat amb placebo	89 nens amb TDAH	Blanca, negra, hispana/latina, altres	≤25 kg: 18, 27, 36 mg de MPH o placebo; >25 kg: 18, 36, 54 mg de MPH o placebo	4 setmanes	VADPRS; VADTRS	Canvis en les puntuacions a VADPRS i VADTRS	Associació entre al·lel G i mala resposta
ADRA2A	-1291 C>G (rs1800544) 1780 C>T (rs553668)	Kim et al., 2011	Obert, prospectiu	102 nens amb TDAH	Coreana	0,24±0,3 mg/kg (basal); 0,98±0,5 mg/kg (setmana 12)	12 setmanes	ADHD-RS; CGI-S; CGI-I	Puntuació total a ADHD-RS ≤18, puntuació a cada ítem de l'ADHD-RS ≤1 i puntuació a CGI-I ≤2; Reducció de les puntuacions a ADHD-RS ≥50%; Compliment de tots els criteris anteriors	No associació No associació
ADRA2A	-1291 C>G (rs1800544) 1780 C>T (rs553668)	Hong et al., 2012	Obert, prospectiu	103 nens i adolescents amb TDAH	Coreana	19,8±8,2 mg (basal); 29,1±11,6 mg (setmana 8)	8 setmanes	ADHD-RS; CGI-I	Reducció de la puntuació total a ADHD-RS ≥50% i puntuació a CGI-I ≤2	No associació No associació

Taula 8. Continuació

Gen	Polimorfisme	Referència	Disseny de l'estudi	Mostra	Població	Dosi diària	Durada	Instrument d'avaluació	Definició de la resposta	Resultats
ADRA2A	-1291 C>G (rs1800544)	Hegvik et al., 2016	Naturalístic	564 adults amb TDAH	Caucàsica	N/A	N/A	Qüestionari 1: resposta 'molt bona', 'bona', 'efecte però mala tolerància' i 'no efecte o dubtós'; Qüestionari 2: s'omet opció 'efecte però mala tolerància'	Tres primeres categories del qüestionari 1 o dues primeres del qüestionari 2	Associació entre al·lel G i mala resposta; No confirmada a la meta-anàlisi
ADRA2A	1780 C>T (rs553668)									No associació
ADRA2A	-1291 C>G (rs1800544)	Gomez-Sanchez et al., 2017	Obert, prospectiu	208 nens i adolescents amb TDAH	Caucàsica (Espanya)	35,5±15 mg (basal); 39,5±15,7 mg (mes 3); 39,4±15,8 mg (mes 6); 40,5±15,5 mg (mes 12)	12 mesos	CGI-S; CGAS	Canvis en les puntuacions a CGI-S i CGAS	No associació
ADRA2A	-1291 C>G (rs1800544)	Huang et al., 2018	Naturalístic	59 nens i adolescents amb TDAH	Taiwanesa	N/A	4 setmanes	SNAP-IV	Reducció de les puntuacions a SNAP-IV >25% (resposta moderada) o ≥50% (millor resposta)	Associació entre genotip G/G i millor resposta

Nota: ADHD-RS, de l'anglès *ADHD Rating Scale*; indel, inserció/delecció; CGI-S, de l'anglès *Clinical Global Impression-Severity*; SWAN, de l'anglès *Strengths and Weaknesses of ADHD symptoms and Normal behaviors*; PCA, anàlisi de components principals (de l'anglès *principal component analysis*); CGI-I, de l'anglès *Clinical Global Impression-Improvement*; CGAS, de l'anglès *Children's Global Assessment Scale*; SNAP-IV, de l'anglès *Swanson, Nolan and Pelham, version IV*; VADPRS, de l'anglès *Vanderbilt ADHD Diagnostic Parent Rating Scale*; VADTRS, de l'anglès *Vanderbilt ADHD Diagnostic Teacher Rating Scale*.

^a N/A indica que la informació no s'especifica.

Sistema serotoninèrgic

A més del sistema catecolaminèrgic, múltiples evidències suggereixen la implicació del sistema serotoninèrgic com a factor de predisposició al TDAH. Per una banda, s'ha demostrat la influència d'aquest neurotransmissor en comportaments rellevants per al trastorn com la impulsivitat, l'agressió, la desinhibició i l'atenció (Oades, 2008). Per l'altra, Gainetdinov et al. observaren que l'administració d'un inhibidor selectiu de la recaptació de serotonina reduïa la hiperactivitat en ratolins amb el gen *SLC6A3* delecionat (Gainetdinov et al., 1999).

En relació a la farmacogenètica del TDAH, el principal gen estudiat ha estat el del transportador de serotonina, responsable de la recaptació del neurotransmissor (Taula 9). El gen *SLC6A4* conté un polimorfisme a la regió promotora consistent en la inserció o deleció de 44 pb (5-HTTLPR). En conseqüència, es genera una forma llarga (L) i una forma curta (S) del gen, respectivament, amb activitats transcripcionals diferents (Heils et al., 1996). Més recentment, s'ha descobert que l'al·lel L es pot diferenciar, alhora, en dues variants com a resultat d'un polimorfisme funcional (rs25531 A/G). La variant L_A s'associa a nivells d'expressió elevats mentre que les variants L_G i S mostren una activitat transcripcional inferior (Hu et al., 2006). Thakur i els seus col·laboradors investigaren la relació entre aquest polimorfisme tri·al·lèlic i els canvis en el comportament induïts pel tractament amb MPH en cent cinquanta-set nens amb TDAH. Els individus amb dues còpies de l'al·lel L_A experimentaren una millora significativa dels símptomes relacionats amb el trastorn en resposta al fàrmac, a diferència dels homozigots per a les variants al·lèliques d'expressió disminuïda (S + L_G) en què el MPH no aportà beneficis sobre el placebo (Thakur, Grizenko, Sengupta, Schmitz i Jooper, 2010). De forma similar, Tharoor et al. observaren que els subjectes homozigots per a l'al·lel L_A tendien a millorar més freqüentment la simptomatologia del TDAH, malgrat que l'associació en aquest cas no assolí la significació estadística (Tharoor et al., 2008). Per altra banda, McGough et al. reportaren una interacció entre el polimorfisme 5-HTTLPR i la dosi de fàrmac administrada en el rendiment a una prova matemàtica, així com un efecte significatiu d'una variant VNTR situada a l'intró 2 de *SLC6A4* en la reducció dels símptomes del trastorn (McGough et al., 2009). Tanmateix, existeixen també investigacions, tant en infants com en adults, que han avaluat altres gens serotoninèrgics com *HTR1B*, *HTR2A* o *HTR2C*, a més de *SLC6A4*, totes elles amb resultats negatius (Contini et al., 2012; Gomez-Sanchez et al., 2017; Zeni et al., 2007).

Taula 9. Estudis farmacogenètics sobre l'eficàcia del MPH amb candidats del sistema serotoninèrgic

Gen	Polimorfisme	Referència	Disseny de l'estudi	Mostra	Població	Dosi diària	Durada	Instrument d'avaluació	Definició de la resposta	Resultats
<i>SLC6A4</i>	5HTTLPR	Zeni et al., 2007	Naturalístic	111 nens i adolescents amb TDAH	Brasilera (origen europeu)	0,5 mg/kg	30 dies	SNAP-IV; CGAS	Canvis en les puntuacions a SNAP-IV i CGAS	No associació
<i>SLC6A4</i>	5HTTLPR rs25531	Tharoor et al., 2008	Naturalístic, retrospectiu	104 bessons tractats amb MPH per als símptomes de TDAH	Americana	N/A ^a	N/A	MAGIC	Informe patèrn (sí/no) sobre la millora dels símptomes de TDAH	No associació No associació
<i>SLC6A4</i>	5HTTLPR Stin2	McGough et al., 2009	Aleatoritzat, doble cec, intrasubjecte, controlat amb placebo	82 nens i adolescents amb TDAH	No hispana blanca, hispana blanca, negra, asiàtica, altres	<25 kg: 15, 30, 45 mg de MPH o placebo; ≥25 kg: dosi addicional 60 mg	4 o 5 setmanes	ADHD-RS; SWAN	PCA: dos components (síntomes de TDAH i correcció de problemes matemàtics) derivats de sis mesures d'eficàcia	Interacció gen x dosi en correcció de problemes matemàtics Associació amb símptomes de TDAH
<i>SLC6A4</i>	5HTTLPR rs25531	Thakur et al., 2010	Aleatoritzat, doble cec, intrasubjecte, controlat amb placebo	157 nens amb TDAH	Caucàsica i no caucàsica	≥0,3 mg/kg	2 setmanes	CGI-P; CGI-T	Canvis en les puntuacions a CGI-P i CGI-T	Associació entre genotip L _A /L _A i resposta favorable
<i>SLC6A4</i>	5HTTLPR	Contini et al., 2012	Naturalístic	164 adults amb TDAH	Brasilera (origen europeu)	≥0,3 mg/kg	30 dies	SNAP-IV; CGI-S	Reducció de les puntuacions a SNAP-IV ≥30% i puntuació a CGI-S ≤2; Canvis en les puntuacions a SNAP-IV	No associació
<i>SLC6A4</i>	5HTTLPR Stin2	Gomez-Sanchez et al., 2017	Obert, prospectiu	208 nens i adolescents amb TDAH	Caucàsica (Espanya)	35,5±15 mg (basal); 39,5±15,7 mg (mes 3); 39,4±15,8 mg (mes 6); 40,5±15,5 mg (mes 12)	12 mesos	CGI-S; CGAS	Canvis en les puntuacions a CGI-S i CGAS	No associació No associació
<i>HTR1B</i>	rs6296	Zeni et al., 2007	Naturalístic	111 nens i adolescents amb TDAH	Brasilera (origen europeu)	0,5 mg/kg	30 dies	SNAP-IV; CGAS	Canvis en les puntuacions a SNAP-IV i CGAS	No associació
<i>HTR1B</i>	rs11568817 rs13242041	Contini et al., 2012	Naturalístic	164 adults amb TDAH	Brasilera (origen europeu)	≥0,3 mg/kg	30 dies	SNAP-IV; CGI-S	Reducció de les puntuacions a SNAP-IV ≥30% i puntuació a CGI-S ≤2; Canvis en les puntuacions a SNAP-IV	No associació No associació No associació

Taula 9. Continuació

Gen	Polimorfisme	Referència	Disseny de l'estudi	Mostra	Població	Dosi diària	Durada	Instrument d'avaluació	Definició de la resposta	Resultats
<i>HTR2A</i>	His452Tyr (rs6314)	Zeni et al., 2007	Naturalístic	111 nens i adolescents amb TDAH	Brasilera (origen europeu)	0,5 mg/kg	30 dies	SNAP-IV; CGAS	Canvis en les puntuacions a SNAP-IV i CGAS	No associació
<i>HTR2A</i>	rs7322347	Gomez-Sanchez et al., 2017	Obert, prospectiu	208 nens i adolescents amb TDAH	Caucàsica (Espanya)	35,5±15 mg (basal); 39,5±15,7 mg (mes 3); 39,4±15,8 mg (mes 6); 40,5±15,5 mg (mes 12)	12 mesos	CGI-S; CGAS	Canvis en les puntuacions a CGI-S i CGAS	No associació
<i>HTR2C</i>	rs6318	Gomez-Sanchez et al., 2017	Obert, prospectiu	208 nens i adolescents amb TDAH	Caucàsica (Espanya)	35,5±15 mg (basal); 39,5±15,7 mg (mes 3); 39,4±15,8 mg (mes 6); 40,5±15,5 mg (mes 12)	12 mesos	CGI-S; CGAS	Canvis en les puntuacions a CGI-S i CGAS	No associació

Nota: SNAP-IV, de l'anglès Swanson, Nolan and Pelham, *version IV*; CGAS, de l'anglès *Children's Global Assessment Scale*; MAGIC, de l'anglès *Missouri Assessment for Genetics Interview for Children*; ADHD-RS, de l'anglès *ADHD Rating Scale*; SWAN, de l'anglès *Strengths and Weaknesses of ADHD symptoms and Normal behaviors*; PCA, anàlisi de components principals (de l'anglès *principal component analysis*); CGI-P, de l'anglès *Commers' Global Index-Parents*; CGI-T, de l'anglès *Commers' Global Index-Teacher*; CGI-S, de l'anglès *Clinical Global Impression-Severity*.

^a N/A indica que la informació no s'especifica.

Enzims implicats en la síntesi i degradació

Els gens que codifiquen enzims implicats en la síntesi i degradació dels neurotransmissors catecolaminèrgics i la serotonina constitueixen també un grup de candidats interessants per a l'estudi de la variabilitat interindividual en la resposta al MPH. No obstant això, de tots ells, només la catecol-O-metiltransferasa ha estat investigada en diverses ocasions. Aquest enzim catalitza la degradació de la dopamina i la noradrenalina, especialment al còrtex prefrontal on regula els nivells de catecolamines a l'espai sinàptic (Faraone, Bonvicini i Scassellati, 2014). El gen *COMT* conté un polimorfisme funcional consistent en la substitució de l'aminoàcid valina per la metionina al codó 158 (Val158Met – rs4680) que altera de forma significativa l'activitat enzimàtica (Lachman et al., 1996; Lotta et al., 1995). Els primers estudis farmacogenètics que avaluaren el possible rol d'aquesta variant en la modulació dels efectes del MPH mostraren una associació positiva entre l'al·lel Val, de més activitat, i la resposta al tractament, especialment pel que fa als símptomes d'hiperactivitat/impulsivitat (Cheon, Jun i Cho, 2008; Kereszturi et al., 2008). De forma similar, Froehlich i els seus col·laboradors observaren que els individus homozigots per a l'al·lel Val experimentaven una millora notable, encara que no estadísticament significativa, dels símptomes hiperactius/impulsius amb dosis creixents del fàrmac (Froehlich et al., 2011). Per altra banda, i atès que el MPH és capaç d'atenuar altres símptomes a part dels d'inatenció i hiperactivitat/impulsivitat, el grup de Salatino-Oliveira examinà els efectes de la *COMT* sobre la simptomatologia negativista desafiant en cent dotze nens i adolescents amb TDAH, als quals s'havia prescrit MPH. En aquest cas, els resultats de la investigació demostraren que els nois amb l'al·lel Met exhibien una reducció més significativa dels símptomes oposicionistes al llarg del tractament que els individus sense aquest al·lel (Salatino-Oliveira et al., 2011). Anteriorment, un altre estudi ja havia evidenciat la influència d'un polimorfisme funcional al gen de la monoamino oxidasa A en els canvis induïts pel MPH sobre aquests símptomes (Guimarães et al., 2009).

A diferència dels esmentats estudis, realitzats en poblacions infantils, la recerca en adults no ha reportat, fins ara, associacions positives (Contini et al., 2012). Contini et al. investigaren, a més de la *COMT*, altres gens implicats en el metabolisme dels neurotransmissors com *TPH2*, que codifica l'enzim limitant en la síntesi de la serotonina (Walther et al., 2003), o *DBH*, responsable de la conversió de la dopamina a noradrenalina (Faraone et al., 2014). No obstant això, cap d'ells mostrà tenir efectes sobre la resposta terapèutica al MPH.

Els gens *MAOB* (monoamino oxidasa B), *TPHI* (triptòfan hidroxilasa 1), *TH* (tirosina hidroxilasa) i *DDC* (dopa descarboxilasa), en canvi, no han estat explorats en estudis farmacogenètics, malgrat les evidències sobre la seva associació amb el TDAH (Li et al., 2014).

Altres gens candidats

En els darrers anys, la fisiopatologia del TDAH s'ha relacionat amb alteracions en els mecanismes de transmissió sinàptica i plasticitat neuronal. Per aquest motiu, els gens implicats en el neurodesenvolupament han adquirit una important rellevància, tant pel que fa a la susceptibilitat del trastorn com a la variabilitat en la resposta al tractament (Bruxel et al., 2014; Elia et al., 2010; Forero, Arboleda, Vasquez i Arboleda, 2009). En aquest sentit, una revisió recent dels estudis farmacogenètics realitzats en pacients infantils i adults destaca l'efecte significatiu d'aquest grup de gens en contraposició als resultats majoritàriament negatius o discordants aportats pel sistema de neurotransmissors (Bruxel et al., 2014).

Un dels candidats més àmpliament investigats és *SNAP25*, un gen relacionat amb el complex SNARE que regula els processos de trànsit vesicular entre cèl·lules necessaris per a l'exocitosi dels neurotransmissors a l'espai sinàptic (Söllner et al., 1993; Zylbersztejn i Galli, 2011). En un estudi pioner sobre el tractament del TDAH realitzat amb nens en edat preescolar (PATS, de l'anglès *Preschool ADHD Treatment Study*), McGough et al. observaren que els individus homozigots per a l'al·lel T del polimorfisme T1065G experimentaven una millora moderadament superior amb múltiples dosis de MPH, mentre que els homozigots per a l'al·lel T de la variant T1069C exhibien una resposta desfavorable al fàrmac (McGough et al., 2006). Per contra, els resultats obtinguts en nens i adolescents són conflictius; el grup de McGough fou incapaç de replicar, anys més tard, l'associació identificada a l'estudi PATS amb els SNP T1065G i T1069C (McGough et al., 2009). Song i els seus col·laboradors, en canvi, investigaren únicament la variant T1065G en una mostra de cent trenta-nou pacients tractats amb MPH d'alliberació prolongada i revelaren una reducció dels símptomes més significativa en els portadors de l'al·lel T (Song et al., 2014). Recentment, Gomez-Sanchez et al. han confirmat aquesta millora de la simptomatologia associada al polimorfisme T1065G en un estudi sobre l'eficàcia a llarg termini del MPH realitzat en dos-cents vuit nens i adolescents amb TDAH (Gomez-Sanchez et al., 2017). Pel que fa als adults, cap dels SNP de *SNAP25* (T1065G i rs363020) avaluats en l'única

investigació que existeix fins ara no mostrà un efecte significatiu sobre la resposta al tractament (Contini et al., 2012).

La resta de membres del complex SNARE, entre els quals destaquen la syntaxina 1A (STX1A) i la proteïna de membrana associada a vesícules VAMP2 (de l'anglès *vesicle-associated membrane protein 2*), han estat investigats, per primera vegada, en relació a la farmacogenètica del TDAH en un estudi portat a terme l'any 2017. Els autors avaluaren, a més, de *STX1A* i *VAMP2*, el gen *SYT1* que codifica la sinaptotagmina 1, una proteïna reguladora sensible al calci necessària per a l'exocitosi de les vesícules sinàptiques (Fernández-Chacón et al., 2001; Südhof, 2013), en una mostra de 272 pacients adults. Els resultats d'aquesta investigació suggereixen que *SYT1* podria influir els efectes del MPH, atès que l'SNP rs2251214 mostrà una associació tant amb la reducció dels símptomes, especialment d'inatenció i de trastorn negativista desafiant, com amb l'adherència al tractament (da Silva et al., 2017).

Un altre gen important per a la regulació de l'alliberament de neurotransmissors és la latrofilina 3 (Rahman et al., 1999), la pèrdua del qual condueix a alteracions en el desenvolupament de les vies dopaminèrgiques i en l'expressió de gens dopaminèrgics i serotoninèrgics, a més de produir un fenotip hiperactiu (Lange et al., 2012; Wallis et al., 2012). D'acord amb aquestes observacions, les variants a *LPHN3* han estat identificades com a factors de risc per al TDAH i, més recentment, s'ha demostrat que podrien modular també la resposta terapèutica al MPH. Arcos-Burgos i els seus col·laboradors foren els primers en reportar una associació entre l'SNP rs6551665 i l'eficàcia del tractament psicoestimulant. En concret, observaren que els portadors de l'al·lel G presentaven una millor resposta a la medicació, especialment pel que fa als símptomes d'inatenció (Arcos-Burgos et al., 2010). Un estudi posterior, en canvi, relacionà aquest mateix al·lel amb un risc superior de resistència al tractament amb MPH i identificà, a més, tres altres marcadors (rs1947274, rs2345039 i rs6858066) com a predictors potencials de la resposta al fàrmac (Labbe et al., 2012). No obstant això, Bruxel et al. detectaren una interacció entre la durada del tractament i els haplotips rs6551665-rs1947275 i rs6813183-rs1355368-rs734644 que confirmava els primers resultats obtinguts, atès que els individus homozigots per a les combinacions al·lèliques GT i CGC, respectivament, mostraren una millora dels símptomes més ràpida (Bruxel et al., 2015). Finalment, existeixen estudis en què no ha estat possible replicar les associacions prèviament identificades (Gomez-Sanchez et al., 2017; Song et al., 2014), si bé, en alguns casos, han permès establir-ne de noves (Gomez-Sanchez et al., 2017).

El darrer gen implicat en el neurodesenvolupament que ha estat analitzat pel que fa als efectes del tractament amb MPH és *BDNF*, malgrat que, fins ara, només un estudi ha explorat aquesta possible relació (Kim et al., 2011). Els resultats d'aquesta investigació, realitzada en cent dos pacients infantils tractats amb MPH d'alliberació prolongada, mostren una associació significativa entre el genotip Val/Val del polimorfisme funcional Val66Met i una resposta favorable al fàrmac, avaluada a través de quatre criteris diferents.

2.4.1.2. Gens candidats relacionats amb la farmacocinètica

La majoria d'estudis farmacogenètics realitzats en TDAH s'han centrat en avaluar els efectes de la variabilitat genètica en dianes terapèutiques (principalment transportadors i receptors) sobre l'eficàcia del MPH. Per contra, la influència de polimorfismes en gens relacionats amb la seva farmacocinètica ha rebut una escassa atenció, probablement per falta de candidats plausibles atès que les vies metabòliques del fàrmac no es coneixen amb exactitud (Bruxel et al., 2014; Contini et al., 2013; Froehlich et al., 2010; Kieling, Genro, Hutz i Rohde, 2010). En aquest sentit, Patrick i els seus col·laboradors identificaren, com a part d'un estudi farmacocinètic que pretenia avaluar la interacció entre el MPH i l'etanol en voluntaris sans, un individu amb unes concentracions plasmàtiques i una vida mitjana del fàrmac inusualment elevades, fet que suggeria un dèficit en la seva capacitat metabolitzadora (Patrick et al., 2007). D'acord amb aquesta hipòtesi, Zhu et al. seqüenciaren el gen que codifica la carboxilesterasa 1 (*CES1*) en aquest individu metabolitzador lent i descobriren dos polimorfismes no sinònims, Gly143Glu i Asp260fs, responsables de reduir *in vitro* l'activitat catalítica de l'enzim de forma dràstica (Zhu et al., 2008). Finalment, un estudi realitzat per Nemoda et al. en què s'avaluà la possible associació entre la variant funcional Gly143Glu i els efectes del tractament amb MPH en cent vint-i-dos nens amb TDAH indicà que, malgrat no existir diferències quant a la resposta, els portadors de l'al·lel Glu requerien dosis de fàrmac inferiors per a la reducció de la simptomatologia (Nemoda, Angyal, Tarnok, Gadoros i Sasvari-Szekely, 2009).

2.4.2. Estudis a escala genòmica

Els estudis a escala genòmica també resulten útils per identificar regions i gens potencialment implicats en la resposta al MPH. Tanmateix, fins ara, només dues investigacions han emprat aquestes estratègies amb l'objectiu d'establir les bases genètiques

subjacents als efectes terapèutics del fàrmac. A través d'una anàlisi de *loci* de trets quantitativs realitzada en cent dos pacients infantils en tractament amb MPH, van der Meulen et al. suggeriren l'existència d'un cert lligament entre la resposta clínica i regions situades als cromosoma 7, 3, 5 i 9 (van der Meulen, Bakker, Pauls, Sinnke i Buitelaar, 2004). Mick i els seus col·laboradors, en canvi, avaluaren, per mitjà d'un GWAS, l'eficàcia d'un sistema transdèrmic de MPH en cent vuitanta-set nens amb TDAH. Malgrat no assolir el llindar de significació genòmica, els autors detectaren associacions nominals en els gens del receptor metabotrópic de glutamat *GRM7* i del transportador de noradrenalina *SLC6A2* (Mick, Neale, Middleton, McGough i Faraone, 2008).

2.4.3. Estudis d'interaccions gen × gen i gen × ambient

Actualment, existeix un consens cada vegada més ampli en considerar la resposta farmacològica com una matriu complexa amb múltiples factors genètics i ambientals implicats. Estudis recents, de fet, evidencien que les interaccions gen × gen són capaces de modificar la resposta a fàrmacs antipsicòtics i antidepressius (Gonçalves et al., 2014; Hwang et al., 2011; Lohoff, Narasimhan i Rickels, 2013; Ryu et al., 2011), a més d'influir la susceptibilitat a nombroses malalties humanes, entre elles, els trastorns psiquiàtrics (Jain et al., 2012; Kang et al., 2011; Sullivan et al., 2013). Per aquest motiu, les investigacions que avaluen un únic o un nombre molt reduït de polimorfismes sense tenir en compte la possible interacció entre ells o amb variables ambientals no semblen l'estratègia més apropiada per a l'estudi de la farmacogenètica (Bruxel et al., 2014). No obstant això, en el cas del TDAH, la recerca sobre els efectes epistàtics dels gens en la resposta clínica al MPH és molt limitada. En un estudi pioner, realitzat l'any 2001 en quaranta-set nens amb TDAH, Seeger et al. observaren que els pacients portadors de l'al·lel 7R de *DRD4* i homozigots per a la forma llarga del gen *SLC6A4* experimentaven una millora menys significativa en el funcionament general com a resultat del tractament amb MPH (Seeger, Schloss i Schmidt, 2001); uns resultats, tanmateix, que no foren posteriorment replicats (Tharoor et al., 2008). Més endavant, Hong et al. identificaren també efectes interactius sobre la resposta al fàrmac entre els gens *DRD4* i *ADRA2A*, i entre *ADRA2A* i *SLC6A2* en una mostra de cent tres infants i adolescents (Hong et al., 2012) mentre que Thakur i els seus col·laboradors fracassaren en avaluar l'epístasi entre *SLC6A3* i *SLC6A4* (Thakur et al., 2010). Finalment, Jain et al. detectaren una interacció entre *LPHN3* i un haplotip situat a la regió 11q que comprèn els gens *DRD2* i *NCAM1* (de l'anglès *neural cell adhesion molecule 1*), responsable de modular

els efectes del tractament amb MPH i de doblar el risc a desenvolupar TDAH (Jain et al., 2012).

De forma similar, els estudis dirigits a investigar les interaccions $G \times E$ en relació a l'eficàcia del MPH són escassos, malgrat les nombroses evidències sobre la influència dels estressors ambientals en l'etiologia del trastorn. En concret, Grizenko et al. examinaren si la gravetat de l'estrès sofert per la mare durant l'embaràs afectava la resposta farmacològica de la descendència però no trobaren diferències significatives entre els individus que milloraven amb la medicació i els que no pel que fa al nivell d'estrès matern (Grizenko, Shayan, Polotskaia, Ter-Stepanian i Joobar, 2008). Per contra, un estudi posterior en que s'avaluà l'efecte conjunt d'SNP en el gen *LPHN3* i l'exposició prenatal a tabac o estrès revelà una associació significativa entre *LPHN3* i la resposta al tractament, únicament observable en el grup d'individus amb mares que havien experimentat un estrès mínim o lleu (Choudhry et al., 2012). El consum de tabac durant l'embaràs, en canvi, no mostrà cap interacció amb els SNP investigats. Tanmateix, Thakur et al. detectaren una associació altament significativa entre la resposta terapèutica i els SNP rs36021 i rs3785152 de *SLC6A2* després d'estratificar els pacients en funció de si havien estat exposats o no al tabac abans de néixer (Thakur, Sengupta, Grizenko, Choudhry i Joobar, 2012).

2.5. Estudis farmacogenètics sobre la tolerabilitat al MPH

Malgrat que tradicionalment la recerca farmacogenètica ha posat l'èmfasi en la millora simptomatològica induïda pel tractament amb MPH, en els darrers anys la identificació de predictors genètics de la tolerabilitat al fàrmac ha atret un notable interès donada la seva rellevància clínica ja que l'aparició d'efectes adversos representa un dels principals impediments per al compliment terapèutic (Bruxel et al., 2014; Contini et al., 2013; Stein i McGough, 2008). No obstant això, els estudis realitzats amb aquesta finalitat resulten encara minoritaris i s'han centrat fonamentalment en gens del sistema de neurotransmissors o del neurodesenvolupament prèviament investigats en relació a l'eficàcia.

Així, per exemple, Gruber et al. avaluaren la presència de l'al·lel 9R del gen *SLC6A3*, anteriorment associat a una menor resposta al MPH, en cent setanta-set pacients infantils amb TDAH. Les puntuacions obtingudes pels participants a l'escala SERS van ser reduïdes, mitjançant una anàlisi de components principals (PCA, de l'anglès *principal component analysis*), a tres factors que explicaven un 57,7% de la variància total: 'emocionalitat',

‘queixes somàtiques’ i ‘alerta excessiva’. Els investigadors observaren que els individus amb el genotip 9/9 presentaven més efectes adversos de caràcter emocional, com ara irritabilitat, tristesa o tendència a plorar, mentre que els pacients homozigots per a l'al·lel 10R expressaven un major nombre de queixes somàtiques (p. e., disminució de l’apetit o insomni) durant el tractament amb MPH (Gruber et al., 2009). Aquests resultats foren parcialment confirmats en un estudi posterior en què els individus portadors de l'al·lel 10R puntuaven significativament més alt en la dimensió de ‘queixes somàtiques’ (Stein et al., 2014) però, en canvi, contrasten amb els de Leddy i els seus col·laboradors, segons els quals els pacients amb el genotip 9/9 són especialment sensibles a l’efecte anorexigen del fàrmac (Leddy et al., 2009). A aquestes discrepàncies, a més, s’hi sumen les investigacions on no s’ha trobat cap associació entre el gen *SLC6A3* i la tolerabilitat al MPH (McGough et al., 2006; McGough et al., 2009; Mick et al., 2006; Purper-Ouakil et al., 2008; Zeni et al., 2007).

Els gens que codifiquen els receptors dopaminèrgics, especialment *DRD4*, també han estat avaluats com a potencials predictors dels efectes adversos en diversos estudis (Leddy et al., 2009; Levy, Wimalaweera, Moul, Brennan i Dadds, 2013; McGough et al., 2006; Zeni et al., 2007). Entre ells, l’estudi PATS demostrà, per una banda, que els nens homozigots per a l'al·lel 4R de *DRD4* presentaven més freqüentment comportaments d’acaparament i, per l’altra, que l'al·lel 7R incrementava el risc de retraïment social davant de dosis creixents del fàrmac (McGough et al., 2006), malgrat que Levy i els seus col·laboradors no detectaren aquesta darrera associació amb *DRD4*, sinó amb *DRD1* (Levy et al., 2013).

Pel que fa al sistema noradrenèrgic, els resultats més rellevants són els aportats per Cho et al., que relacionaren els canvis en la freqüència cardíaca i la pressió diastòlica induïts pel tractament amb MPH amb els gens *SLC6A2* i *ADRA2A*, respectivament, en una mostra de cent un pacients infantils (Cho, Kim, Cummins, Kim i Bellgrove, 2012).

Altres gens implicats en el sistema de neurotransmissors també han mostrat un efecte modulador sobre la tolerabilitat a la medicació, tot i els resultats negatius obtinguts en alguns casos (Thakur et al., 2010; Zeni et al., 2007). En concret, McGough et al. identificaren, en un estudi realitzat amb vuitanta-dos nens i adolescents amb TDAH, una associació entre el polimorfisme Val158Met del gen *COMT* i l’aparició d’irritabilitat, així com entre la variant 5-HTTLPR i la presència de símptomes vegetatius (p. e., apatia, trastorns del son o pèrdua d’apetit) (McGough et al., 2009). Més recentment, en canvi, Park i els seus col·laboradors han reportat una correlació positiva entre el nombre d’al·lels L d’aquest polimorfisme a

SLC6A4 i l'ocurrència de tics o la tendència a mossegar-se les ungles després del tractament amb MPH (Park, Kim i Cheon, 2015).

En aquest sentit, convé destacar que l'estudi PATS ja havia suggerit una possible associació entre la presència de tics i altres moviments anormals i la variant T1069C del gen *SNAP25* (McGough et al., 2006). Finalment, l'any 2014 es proposà com a candidat la neurotrofina 3 (*NTF3*), un factor neurotròfic prèviament estudiat en la fisiopatologia dels trastorns de l'estat d'ànim (Duman, 2002; Fernandes et al., 2010; Hock et al., 2000). Els resultats d'aquesta investigació, realitzada en noranta-sis pacients infantils tractats amb MPH, revelaren que els individus homozigots per a l'al·lel A de l'SNP rs6332 mostraven unes puntuacions significativament més elevades en les dimensions derivades del PCA 'emocionalitat' i 'alerta excessiva/eufòria', en particular, en els ítems de l'escala SERS 'tendència a plorar' i 'mossegar-se les ungles', fet que resulta consistent amb la implicació d'aquest gen en els problemes emocionals (Park et al., 2014).

Com en el cas de l'eficàcia, els gens relacionats amb la farmacocinètica del MPH han rebut una menor atenció, malgrat que les dades aportades suggereixen la seva participació en la susceptibilitat als efectes adversos. Després que Zhu et al. evidenciessin alteracions en els nivells plasmàtics del fàrmac i canvis hemodinàmics com a conseqüència de mutacions que disminueixen l'activitat de la carboxilesterasa 1 (Zhu et al., 2008), el gen *CES1* ha estat associat a l'aparició de tristesa i a una notable reducció de l'apetit durant el tractament amb MPH (Bruxel et al., 2013; Johnson et al., 2013). Per altra banda, la influència de gens com *ABCB1*, que codifica una glicoproteïna-P transportadora responsable d'expulsar una gran varietat de compostos a través de la membrana cel·lular, també ha estat investigada. Kim i els seus col·laboradors analitzaren l'ocurrència d'efectes adversos en cent trenta-quatre nens i adolescents tractats amb MPH per al TDAH i identificaren que els individus homozigots per a l'al·lel T del polimorfisme 2677 G>T presentaven una tolerabilitat al fàrmac menor que els pacients amb altres genotips. A continuació, els autors comprovaren, a través d'un estudi funcional, que l'al·lel T reduïa l'activitat transportadora d'*ABCB1*, fet que, segons ells, podia conduir a augmentar la biodisponibilitat del fàrmac i resultar en l'aparició d'efectes adversos (Kim et al., 2013).

Finalment, a part dels esmentats estudis basats en gens candidats, l'any 2011 es portà a terme l'únic GWAS que existeix actualment en relació a la tolerabilitat del MPH. A partir de la mostra utilitzada per a l'estudi a escala genòmica de l'eficàcia del fàrmac, Mick et al. avaluaren els canvis en la pressió arterial induïts pel tractament amb un sistema transdèrmic

de MPH en cent quaranta pacients infantils. Malgrat no detectar cap associació estadísticament significativa, els resultats obtinguts posaren de manifest gens relacionats amb la regulació de la pressió arterial i altres fenotips cardiovasculars, com ara un SNP en un intercanviador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ dependent de K^+ (*SLC24A3*) que s'expressa al múscul llis vascular (Mick, McGough, Middleton, Neale i Faraone, 2011).

2.6. Limitacions

En definitiva, els estudis sobre la farmacogenètica del MPH realitzats en pacients amb TDAH han aportat resultats majoritàriament conflictius, fet que dificulta l'establiment de conclusions definitives. Aquestes discrepàncies es deuen, principalment, a la variabilitat metodològica existent pel que fa al disseny de l'estudi (estudis retrospectius, naturalístics, oberts, controlats amb placebo, etc.), les característiques dels individus (sexe, edat, ètnia, etc.), les dosis administrades, els instruments d'avaluació, la definició de la resposta farmacològica, la font d'informació (pacient, pares i/o mestres, etc.) o la identificació i control de variables de confusió (p. e., puntuacions basals, comorbiditats, subtipus clínics o medicació concomitant), entre d'altres (Bruxel et al., 2014). La majoria d'investigacions, a més, s'han centrat en únic o un nombre molt limitat de polimorfismes que poden no ser funcionals, trobar-se excessivament lluny de la veritable variant causal o exercir un efecte massa petit com per poder detectar una associació fiable en mostres reduïdes (Mick et al., 2008). Per altra banda, l'exposició a diferents influències ambientals, capaces de modular els efectes dels factors genètics, així com les interaccions establertes entre múltiples gens, també poden ser responsables de l'absència de resultats consistents obtinguts fins ara (Froehlich et al., 2010).

Objectius

1. Hipòtesis i objectius

- 1.1. Hipòtesi 1
- 1.2. Hipòtesi 2
- 1.3. Hipòtesi 3

1. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

1.1. Hipòtesi 1

Donades les evidències següents:

- El TDAH presenta una heretabilitat estimada del 70-80%.
- Nombrosos estudis prospectius han demostrat la persistència del trastorn en una proporció significativa dels adults diagnosticats durant la infantesa.
- Múltiples evidències procedents d'estudis de neuroimatge, farmacologia, genètica i models animals suggereixen la implicació del sistema dopaminèrgic com a factor de predisposició al TDAH.
- El sistema noradrenèrgic està implicat en la regulació de funcions rellevants per al TDAH. A més, els inhibidors de la recaptació de noradrenalina, com el MPH o l'atomoxetina, redueixen de forma efectiva els símptomes del trastorn.
- Els gens *CES1* i *CYP2D6* codifiquen enzims que metabolitzen el MPH i l'atomoxetina, respectivament. Les alteracions en aquests gens s'han relacionat amb la resposta farmacològica en pacients amb TDAH.
- El gen *LPHN3* interacciona amb el sistema de neurotransmissió dopaminèrgica i ha estat identificat com a factor de risc per al TDAH, a més de modular la resposta terapèutica al MPH.
- A més dels factors de risc genètics, s'han descrit nombroses variables ambientals amb efectes sobre la gravetat dels símptomes de TDAH.
- Les investigacions que avaluen les interaccions $G \times E$ potencialment implicades en l'etiologia o la gravetat del TDAH són escasses.

Es planteja com a hipòtesi:

La variabilitat en gens relacionats amb el sistema de neurotransmissió dopaminèrgica i noradrenèrgica o amb la farmacocinètica del MPH i l'atomoxetina es troba implicada en la persistència del TDAH a l'edat adulta. L'exposició a esdeveniments vitals adversos, a més, exerceix un efecte sobre la gravetat de la simptomatologia que pot ser modulada per factors genètics específics.

1.1.1. Objectius

1. Identificar factors genètics de risc per al TDAH adult mitjançant l'anàlisi de variants potencialment funcionals en vuit gens candidats clàssics (*DRD4*, *SLC6A3*, *COMT*, *ADRA2A*, *CES1*, *CYP2D6*, *LPHN3* i *OPRM1*).
2. Investigar la influència d'experiències estressants durant la infantesa en la gravetat actual del trastorn.
3. Avaluar les possibles interaccions $G \times E$ establertes entre els factors genètics de risc i l'adversitat ambiental sobre la gravetat de la simptomatologia.

1.2. Hipòtesi 2

Donades les evidències següents:

- El MPH és un inhibidor de la recaptació de dopamina i noradrenalina àmpliament utilitzat en el tractament farmacològic del TDAH. No obstant això, aproximadament un 30% dels pacients tractats amb el fàrmac no respon adequadament o interromp la teràpia com a conseqüència, en la majoria dels casos, de l'aparició d'efectes adversos.
- Nombrosos estudis d'associació suggereixen que la variabilitat interindividual en els efectes terapèutics del MPH està determinada, entre d'altres, per factors genètics.
- Tradicionalment, la recerca farmacogenètica realitzada en pacients amb TDAH ha posat l'èmfasi en l'eficàcia del MPH. La tolerabilitat del fàrmac, en canvi, ha rebut una escassa atenció.
- Les investigacions anteriors s'han centrat de forma quasi exclusiva en components del sistema catecolaminèrgic i, més concretament, en els gens *SLC6A3*, *DRD4* i *COMT*.
- La majoria d'estudis han avaluat un únic o un nombre molt reduït de polimorfismes en base a la seva presumpta rellevància funcional, sense tenir en compte la possible interacció entre ells o amb influències ambientals.

Es planteja com a hipòtesi:

Els efectes terapèutics del MPH estan determinats per polimorfismes en gens del sistema dopaminèrgic i per l'exposició a variables ambientals pre i perinatals, capaces de modular la influència dels factors genètics.

1.2.1. Objectius

1. Identificar factors genètics associats a la resposta i tolerabilitat al MPH en una mostra de pacients pediàtrics amb TDAH a través de l'anàlisi de múltiples SNP en gens que codifiquen els receptors dopaminèrgics (*DRD1*, *DRD2*, *DRD3*, *DRD4* i *DRD5*), el transportador de dopamina (*SLC6A3*) i tres enzims responsables de la síntesi (*TH*) i degradació (*COMT* i *DBH*) del neurotransmissor.
2. Avaluar les possibles interaccions gen \times gen establertes entre els *loci* identificats sobre els efectes terapèutics del MPH.
3. Investigar la influència de variables ambientals pre i perinatals en la resposta clínica i el risc d'aparició d'efectes adversos a la medicació.
4. Avaluar les possibles interaccions G \times E establertes entre els factors de risc genètics i ambientals identificats sobre els efectes terapèutics del MPH.

1.3. Hipòtesi 3

Donades les evidències següents:

- Els estudis sobre la farmacogenètica del MPH basats en gens candidats han aportat resultats majoritàriament conflictius.
- Els GWAS representen una alternativa als estudis d'associació basats en gens candidats ja que avaluen SNP al llarg de tot el genoma sense necessitat d'una hipòtesi prèvia.
- En els darrers anys s'han realitzat múltiples GWAS que han permès la identificació de nous factors genètics de risc per al TDAH. En canvi, pel que fa a la farmacogenètica, només una investigació ha avaluat l'eficàcia del MPH a través d'aquesta estratègia.
- Els estudis d'enriquiment i de vies de senyalització aporten informació sobre les funcions cel·lulars i les vies biològiques implicades en l'etiologia d'un trastorn.

Es planteja com a hipòtesi:

L'anàlisi de variants genètiques a escala genòmica, combinada amb dades d'anotació funcional, *loci* de trets quantitius d'expressió (eQTL, de l'anglès *expression quantitative trait loci*) en cervell humà i enriquiment en funcions i vies biològiques, permet identificar nous *loci* genètics i mecanismes moleculars implicats en els efectes terapèutics del MPH.

1.3.1. Objectius

1. Identificar marcadors farmacogenètics de la resposta al MPH en una mostra pediàtrica de pacients amb TDAH a través de la realització d'un GWAS.
2. Prioritzar les variants genètiques identificades mitjançant eines de predicció funcional i l'anàlisi d'eQTL en cervell d'individus sans.
3. Caracteritzar les principals funcions i vies biològiques en què es troben implicats els gens l'expressió cortical dels quals es troba regulada per polimorfismes associats a la resposta clínica.
4. Explorar el possible enriquiment en candidats prèviament relacionats amb el TDAH o el tractament amb MPH entre els gens identificats.
5. Fer el seguiment dels principals senyals obtinguts en una cohort independent de pacients adults amb TDAH a través del càlcul de puntuacions de risc poligènic i/o d'estratègies meta-analítiques.

Resultats

1. Informe dels directors sobre la contribució de la doctorand a les publicacions de la present tesi doctoral

- 1.1. Publicació 1
- 1.2. Publicació 2
- 1.3. Publicació 3

2. Resultats

- 2.1. Estudi 1. Implicació del gen *DRD4* i dels esdeveniments vitals estressants en la persistència del TDAH
- 2.2. Estudi 2. Farmacogenètica de la resposta i tolerabilitat al MPH en pacients infantils amb TDAH
- 2.3. Estudi 3. Anàlisi genòmica integradora de la resposta al MPH en pacients infantils amb TDAH

1. INFORME DELS DIRECTORS SOBRE LA CONTRIBUCIÓ DE LA DOCTORAND A LES PUBLICACIONS DE LA PRESENT TESI DOCTORAL

Títol de la tesi: Bases genètiques del trastorn per dèficit d'atenció amb hiperactivitat i de la resposta farmacològica al metilfenidat

Autora: Mireia Pagerols Teixidó

Directors: Dra. Marta Ribasés Haro i Dr. Josep Antoni Ramos Quiroga

1.1. Publicació 1

Títol: Dopamine receptor DRD4 gene and stressful life events in persistent attention deficit hyperactivity disorder

Autors: Sánchez-Mora, C., Richarte, V., Garcia-Martínez, I., Pagerols, M., Corrales, M., Bosch, R., Vidal, R., Viladevall, L., Casas, M., Cormand, B., Ramos-Quiroga, J. A., Ribasés, M.

Revista: Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2015; 168(6): 480-491.

Índexs de qualitat: Factor d'impacte (IF) = 3,391; 2n quartil de les àrees *Genetics & Heredity* (posició 53 de 166) i *Psychiatry* (posició 41 de 142).

Aportació personal a l'article: Participació en el disseny de l'estudi; extracció d'ADN i preparació de les mostres per a la seva genotipació; anàlisi estadística; participació en l'edició final del manuscrit.

1.2. Publicació 2

Títol: Pharmacogenetics of methylphenidate response and tolerability in attention-deficit/hyperactivity disorder

Autors: Pagerols, M., Richarte, V., Sánchez-Mora, C., Garcia-Martínez, I., Corrales, M., Corominas, M., Cormand, B., Casas, M., Ribasés, M., Ramos-Quiroga, J. A.

Revista: Pharmacogenomics J. 2017; 17(1): 98-104.

Índexs de qualitat: IF = 3,812; 1r quartil de l'àrea *Pharmacology & Pharmacy* (posició 50 de 261) i 2n quartil de l'àrea *Genetics & Heredity* (posició 49 de 171).

Aportació personal a l'article: Participació en el disseny de l'estudi; extracció d'ADN i preparació de les mostres per a la seva genotipació; anàlisi estadística; elaboració del primer esborrany del manuscrit i participació en l'edició final.

1.3. Publicació 3

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

Autors: Payerols, M., Richarte, V., Sánchez-Mora, C., Rovira, P., Soler Artigas, M., Garcia-Martínez, I., Calvo-Sánchez, E., Corrales, M., da Silva, B. S., Mota, N. R., Victor, M. M., Rohde, L. A., Grevet, E. H., Bau, C. H. D., Cormand, B., Casas, M., Ramos-Quiroga, J. A., Ribasés, M.

Revista: Sci Rep. 2018; 8(1): 1881.

Índexs de qualitat: IF = 4,122; 1r quartil de l'àrea *Multidisciplinary sciences* (posició 12 de 64).

Aportació personal a l'article: Participació en el disseny de l'estudi; extracció d'ADN i preparació de les mostres per a la seva genotipació; anàlisi estadística; elaboració del primer esborrany del manuscrit i participació en l'edició final.

Barcelona, 2 de juliol de 2018

Signat pels directors:

Dra. Marta Ribasés Haro

Dr. Josep Antoni Ramos Quiroga

2. RESULTATS

2.1. Estudi 1. Implicació del gen *DRD4* i dels esdeveniments vitals estressants en la persistència del TDAH

2.1.1. Resum

Per mitjà d'un estudi d'associació cas-control amb vuit gens candidats (*DRD4*, *DAT1/SLC6A3*, *COMT*, *ADRA2A*, *CES1*, *CYP2D6*, *LPHN3* i *OPRM1*), la present investigació aportà evidències sobre la contribució de la duplicació en tàndem de 120 pb i el VNTR de 48 pb a *DRD4* en l'etiologia del TDAH a l'edat adulta. A més, s'avaluà la influència d'experiències estressants durant la infantesa en la gravetat actual del trastorn, així com la possible interacció entre l'adversitat ambiental i les variants genètiques de risc identificades. L'anàlisi d'interaccions $G \times E$ revelà un efecte dels esdeveniments vitals estressants sobre la gravetat del TDAH, especialment destacable pel que fa als símptomes d'inatenció en els individus no portadors de la combinació al·lèlica L-7R. Els resultats de l'actual estudi, per tant, suggereixen la capacitat de *DRD4* per regular la influència de les experiències adverses i emfasitzen la necessitat d'incloure l'anàlisi d'interaccions $G \times E$ en investigacions futures.

2.1.2. Referència

Sánchez-Mora, C., Richarte, V., Garcia-Martínez, I., Pagerols, M., Corrales, M., Bosch, R., ... Ribasés, M. (2015). Dopamine receptor *DRD4* gene and stressful life events in persistent attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatry Genet*, 168 (6), 480-491.

Dopamine Receptor DRD4 Gene and Stressful Life Events in Persistent Attention Deficit Hyperactivity Disorder

Cristina Sánchez-Mora,^{1,2,3} Vanesa Richarte,² Iris Garcia-Martínez,^{1,2} Mireia Pagerols,^{1,2} Montse Corrales,² Rosa Bosch,² Raquel Vidal,^{2,4} Laia Viladevall,⁵ Miguel Casas,^{1,2,3,4} Bru Cormand,^{6,7,8} Josep Antoni Ramos-Quiroga,^{1,2,3,4} and Marta Ribasés^{1,2,3*}

¹Psychiatric Genetics Unit, Institute Vall d'Hebron Research (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

²Department of Psychiatry, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

³Biomedical Network Research Centre on Mental Health (CIBERSAM), Barcelona, Spain

⁴Department of Psychiatry and Legal Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

⁵AB-Biotics SA, Barcelona, Spain

⁶Departament de Genètica, Universitat de Barcelona, Catalonia, Spain

⁷Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain

⁸Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Catalonia, Spain

Manuscript Received: 7 January 2015; Manuscript Accepted: 22 June 2015

We performed a case-control association study in persistent ADHD considering eight candidate genes (*DRD4*, *DAT1/SLC6A3*, *COMT*, *ADRA2A*, *CES1*, *CYP2D6*, *LPHN3*, and *OPRM1*) and found additional evidence for the involvement of the Dup 120bp and VNTR 48bp functional variants within the dopamine receptor *DRD4* gene in the etiology of adult ADHD. We subsequently investigated the interaction of stressful life events with these two *DRD4* polymorphisms, and the impact of such events on the severity of ADHD symptomatology. The gene-by-environment analysis revealed an independent effect of stressful experiences on the severity of persistent ADHD, and a gene-by-environment interaction on the inattentive dimension

How to Cite this Article:

Sánchez-Mora C, Richarte V, Garcia-Martínez I, Pagerols M, Corrales M, Bosch R, Vidal R, Viladevall L, Casas M, Cormand B, Ramos-Quiroga JA, Ribasés M. 2015. Dopamine Receptor DRD4 Gene and Stressful Life Events in Persistent Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Am J Med Genet Part B* 168B:480–491.

Mireia Pagerols and Iris Garcia-Martínez are recipients of a predoctoral fellowships from the Vall d'Hebron Research Institute (PRED-VHIR-2013 and PRED-VHIR-2012). Marta Ribasés is a recipient of a Miguel Servet contract from the "Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación", Spain (CP09/00119). Cristina Sánchez-Mora is a recipient of a contract from the 7th Framework Programme for Research, technological Development and Demonstration, European Commission (AGGRESSOTYPE_FP7HEALTH2013/602805).

Grant sponsor: 7th Framework Programme for Research, technological Development and Demonstration, European Commission; Grant number: AGGRESSOTYPE_FP7HEALTH2013/602805; Grant sponsor: Fundació La Marató de TV3; Grant number: ref. 092330/31; Grant sponsor: Instituto de Salud Carlos III-FIS; Grant numbers: PI11/00571, PI11/01629, PI12/01139, Red INMA G03/176, CB06/02/0041; Grant sponsor: Plan Nacional Sobre Drogas; Grant number: PNSD#2011-0080; Grant sponsor: Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca-AGAUR, Generalitat de Catalunya; Grant numbers: 2014SGR1357, 2014SGR0932; Grant sponsor: Ministerio de Economía y Competitividad; Grant number: SAF2012-33484; Grant sponsor: Departament de Salut, Government of Catalonia, Spain; Grant sponsor: This project is supported in part by a 2014NARSAD Young Investigator Grant from The Brain and Behavior Research Foundation; Grant number: 22451; Grant sponsor: European College of Neuropsychopharmacology; Grant reference: ECNP Networks.; AB-Biotics, S. A. Development of Genomics and Proteomics Research Foundation; Grant number: 2012/09/GG/150.

*Correspondence to:

Marta Ribasés, Psychiatric Genetics Unit, Group of Psychiatry, Mental Health and Addictions, Vall d'Hebron Research Institute, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. E-mail: mribases@ir.vhebron.net

Article first published online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com): 14 July 2015

DOI 10.1002/ajmg.b.32340

of the disorder, where non carriers of the Dup 120bp (L) - VNTR 48bp (7R) haplotype were more sensitive to environmental adversity than carriers. These results are in agreement with previous works reporting a relationship between *DRD4* and the effect of adverse experiences, which may explain the discordant findings in previous genetic studies and strengthen the importance of gene-by-environment interactions on the severity of ADHD. © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: Attention deficit hyperactivity disorder; ADHD; *DRD4*; Stressful life events; GxE interaction

INTRODUCTION

Attention deficit and hyperactivity disorder (ADHD) is one of the most extensively studied neurodevelopmental disorders in childhood according to DSM-V criteria, with a high prevalence of 5.2%, among children and adolescents [Polanczyk et al., 2007]. In the past, ADHD was considered a childhood disorder that resolved with maturation. However, recent longitudinal follow-up studies have shown that at least 60% of patients diagnosed during childhood continue to suffer ADHD thereafter, with an estimated prevalence in adulthood in the range of 2.5–4.9% [Kessler et al., 2005; Brookes et al., 2006a; Simon et al., 2009; Faraone and Mick, 2010]. Family and twin studies have shown that ADHD is a highly heritable and multifactorial disorder, with approximately 76% of the phenotypic variance explained by genetic factors [Faraone and Mick, 2010]. In this context, the Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium (<http://www.med.unc.edu/pgc/for-investigators/cross-disorder-analysis>) also demonstrated that single nucleotide polymorphisms (SNPs) explain about 28% of the genetic variance of ADHD [Lee and Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2013].

Gene-based studies on ADHD have mainly focused on genes involved in dopaminergic neurotransmission, such as those encoding the dopamine receptor D4 (*DRD4*) or the dopamine transporter (*DAT1/SLC6A3*). Researchers have mainly studied a functional 48bp variable number of tandem repeats (VNTR) in exon 3 of the *DRD4* gene, and have found consistent associations between ADHD and the 7 repeat allele (7R), which is related to decreased functional activity [Aghari et al., 1995], in both children and adults [Johansson et al., 2008; Gizer et al., 2009; Nikolaidis and Gray, 2010; Sánchez-Mora et al., 2011; Tovo-Rodrigues et al., 2012, 2013]. A second polymorphism in *DRD4*, a 120bp duplication located 1.2 kb upstream from the translation start codon that may play a role in transcriptional activity [Paredes et al., 2013], has also been studied in ADHD with controversial results [Barr et al., 2001; D'Souza et al., 2004; Brookes et al., 2005; Bidwell et al., 2011; Hasler et al., 2015].

Since stimulant medication blocks the dopamine transporter, the *DAT1/SLC6A3* gene has also been considered a good candidate for ADHD. Two polymorphisms in this gene, a VNTR 40bp in the 3' untranslated region (3' UTR) and a VNTR 30bp in intron 8, have been studied extensively [Franke et al., 2008; Johansson et al., 2008; da Silva et al., 2011; Kotte et al., 2013; de Azeredo et al., 2014; Tong et al., 2015]. Although the results are inconsistent, and each

polymorphism individually may not explain the association between *DAT1/SLC6A3* and ADHD, different haplotype combinations including these two VNTRs have been associated with ADHD in children and in adults [Laucht et al., 2007; Franke et al., 2010]. A non-synonymous SNP, rs4680 (Val158Met), in the catechol-O-methyltransferase gene (*COMT*) encoding an enzyme involved in catecholamine turnover that regulates the levels of dopamine, norepinephrine and epinephrine in the synaptic cleft, has also been associated with persistent ADHD and with alterations in brain white matter in subjects with ADHD [Reuter et al., 2006; Gothelf et al., 2007; Hallelund et al., 2009; Hong et al., 2014; Lee and Song, 2015]. Other candidate genes have been investigated in adult ADHD and include *ADRA2A*, which encodes the alpha-2A adrenergic receptor involved in adrenaline release and the pharmacological response to methylphenidate [Froehlich et al., 2010; Contini et al., 2011; Park et al., 2013; Castro et al., 2013; McCracken et al., 2014], *LPHN3*, which encodes a member of the latrophilin subfamily of G protein-coupled receptors that may function in both cell adhesion and signal transduction [Arcos-Burgos et al., 2010; Ribases et al., 2011] and genes involved in the metabolism of ADHD medication, such as *CYP2D6* or *CES1*. The *CYP2D6* gene encodes a member of the cytochrome P450 superfamily of monooxygenases that catalyses many reactions involved in the metabolism of drugs such as antidepressants or atomoxetine, a selective norepinephrine reuptake inhibitor used in the treatment of ADHD. Genetic variants of this highly polymorphic gene allow classification of individuals on the basis of their decreased or increased ability to metabolize the enzyme's substrates, and have been associated with the response to atomoxetine in individuals with ADHD [Bonnet et al., 2003; Michelson et al., 2007; Trzepacz et al., 2008; Choi et al., 2014]. Polymorphisms in *CES1*, which encodes a member of the carboxylesterase large family, have also been associated with methylphenidate response and side effects [Nemoda et al., 2009; Johnson et al., 2013].

To date, genome-wide association studies have been performed in nine ADHD datasets, two of which on adult samples [Lasky-Su J et al., 2008a,b; Lesh et al., 2008; Mick et al., 2008; Neale et al., 2008, 2010; Franke et al., 2009; Hinney et al., 2011; Lesch et al., 2011; Stergiakouli et al., 2012; Yang et al., 2013; Sánchez-Mora et al., 2015]. No single marker achieved genome-wide significance, and there was little overlap between the studies or with previous candidate gene association studies. These inconsistent results in genetic studies may be explained in part by gene-by-environment interactions (GxE) [Buitelaar, 2005], where genetic factors may moderate the influence of environmental factors in ADHD. In contrast to the high heritability estimated in ADHD, the contribution of the environment seems to be lower, with around 22% of ADHD variance explained by environmental factors [Hudziak et al., 2005]. A number of environmental risk factors for ADHD have been described, including maternal smoking during pregnancy [Langley et al., 2012; Kovess et al., 2014; Han et al., 2015], institutional deprivation [Kumsta et al., 2010], inter-parental conflict, parenting styles and childhood maltreatment [De Sanctiset al., 2012; Prayez et al., 2012]. In addition, some studies have supported GxE interactions in ADHD, mainly between *DRD4* and exposure to prenatal smoking, *DAT1/SLC6A3* and maternal use of alcohol during pregnancy, institutional deprivation or

psychosocial adversity [Brookes et al., 2006b; Laucht et al., 2007; Stevens et al., 2009], *5HTT* and psychosocial stress [Muller et al., 2008; Retz et al., 2008] and *MAOA* and negative parenting behavior [Li and Lee, 2012].

In the present study we have performed a case-control association study of eight candidate genes encoding proteins involved in the dopaminergic and noradrenergic neurotransmitter systems (*DRD4*, *DAT1/SLC6A3*, *COMT*, and *ADRA2A*), enzymes involved in the pharmacokinetics of methylphenidate or atomoxetine (*CES1* and *CYP2D6*, respectively), Latrophilin 3 (*LPHN3*) and the Opioid Receptor Mu 1 (*OPRM1*) in 604 adults with ADHD and 611 controls. Subsequently, based on previous findings suggesting that environmental factors may be particularly harmful in combination with susceptibility genes [Todd and Neuman, 2007], we investigated the impact of gene-by-environment interactions on the severity of adult ADHD symptoms by considering exposure to adverse life events and the studied ADHD genetic risk variants.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Controls

A total of 604 adult ADHD (60% combined, 36.3% inattentive, and 3.7% hyperactive-impulsive) patients of Caucasian origin from Spain were recruited and evaluated at the Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona, Spain). All subjects met DSM-IV criteria for ADHD. The diagnosis of ADHD in adulthood was evaluated with the Conners' Adult ADHD Diagnostic Interview for DSM-IV (CAADID Parts I and II) and the DSM-IV Axis I and II Disorders (SCID-I and SCID-II). More detailed information on the clinical assessment was provided previously [Sánchez-Mora et al., 2013]. To investigate ADHD severity, a four-point Likert-type scale (from 0 = not at all/never to 3 = very much/very frequently) was used from the inattention and hyperactivity/impulsivity subscales of the ADHD Rating Scale-IV (ADHD-RS), each with nine items [DuPaul, 1998]. The severity of inattention and hyperactivity/impulsivity was measured by counting the number of occurrences in which the informant rated items from each scale at the three different levels of symptom severity. Total ADHD severity was calculated by considering the scores for both the inattention and hyperactivity/impulsivity domains. Childhood stressful life events were assessed retrospectively with the CAADID Part I in 425 subjects with persistent ADHD. A total of 12 life events were assessed for each participant and included: separation or loss, sexual abuse, physical abuse, emotional abuse, domestic violence, emotional and physical neglect, extreme family stress, financial stress and poverty, malnutrition, exposure to heavy metals, other trauma in childhood or adolescence, and prenatal exposure to nicotine.

The control sample consisted of 611 unrelated Caucasoid blood donors matched for gender with the ADHD group in which DSM-IV ADHD symptoms were excluded under the following criteria: (1) no prior ADHD diagnosis and (2) negative answers to the lifetime presence of the following DSM-IV ADHD symptoms: (1) often has trouble keeping attention on tasks, (2) often loses things needed for tasks, (3) often fidgets with hands or feet or squirms in seat, and (4) often gets up from seat when remaining in seat is

expected. The average age at assessment was 33 years (SD = 10.6) for ADHD and 60 years (SD = 14.4) for control subjects. The study was approved by the ethics committees of the participating institutions, and informed consent was obtained from all subjects or parents, in accordance with the Helsinki Declaration.

DNA Isolation and Quantification

Genomic DNA samples were obtained either from peripheral blood lymphocytes by the salting out procedure or from saliva using the Oragene DNA Self-Collection Kit (DNA Genotek, Kanata, Ontario Canada). DNA concentrations were determined using the PicoGreen dsDNA Quantitation Kit (Molecular Probes, Eugene, OR).

Selection of Genes and SNPs

Eight potentially functional biallelic polymorphisms in six candidate genes for ADHD were selected for the association study and included: *COMT* (rs4680), *ADRA2A* (rs1800544), *CES1* (rs121912777), *CYP2D6* (rs3892097), *OPRM1* (rs1799971), *LPHN3* (rs6813183, rs12503398 and rs1868790) and a 120bp insertion/deletion in the promoter region of *DRD4*. Three additional variable number of tandem repeats (VNTR), a VNTR 48bp in exon 3 of *DRD4* and a VNTR 30bp and VNTR 40bp in intron 8 and in the 3' UTR region of *DAT1/SLC6A3*, respectively, were also included in the analysis. All the SNP genotype assays were performed using commercial TaqMan[®] assays in a 7,500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc.). The analyses of 48bp VNTRs and the Dup 120bp polymorphism in *DRD4* were performed using a standard PCR method, as previously described [Sánchez-Mora et al., 2011; Franke et al., 2010], visualized on an ABI 3130XL sequencer, and automatically called using GeneMapper software (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA).

Statistical Analysis

The minimal statistical power was estimated post hoc using Genetic Power Calculator software (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc/>), assuming an odds ratio (OR) of 1.5, disease prevalence of 0.05, significance level of 0.05, the lowest minimum allele frequency (MAF) observed in our control sample (0.166) and a codominant model of inheritance. The presence of population substructures was previously discarded by means of genetic stratification testing using a panel of 45 unlinked non-genic SNPs [Ribasés et al., 2009].

The analysis of Hardy-Weinberg equilibrium (HWE; threshold set at $P < 0.01$) in the control sample and the comparison of genotype and allele frequencies under a codominant genetic model were performed with the SNPassoc R package [Gonzalez et al., 2007] for biallelic markers and with OTT software [Ott J et al., 1985] and the statistical package SPSS 22.0 for VNTRs (SPSS Inc., Chicago, IL). For multiallelic markers, rare genotypes or alleles (MAF < 0.05) were grouped in a single class. For the multiple-marker analysis, haplotype frequencies were estimated using PHASE 2.0 software [Stephens et al., 2001] and values below 5% were grouped as "others" in the association analysis. The frequency of carriers of the risk haplotypes was compared between ADHD subjects and controls using SPSS 22.0.

To assess the contribution of environmental risk factors to ADHD symptom severity, the overall ADHD and the inattentive and hyperactive-impulsive symptom scores were considered. The relationship between symptom severity and the number of stressful life events was evaluated with Pearson's Correlation tests. Gene-by-environment (GxE) interactions were assessed by linear regression models to estimate the association between symptom severity and (i) the Dup 120bp polymorphism, the VNTR 48bp or the Dup 120bp - VNTR 48bp haplotype in *DRD4*, (ii) the number of stressful life events and (iii) their interaction using SPSS 22.0 (SPSS Inc.).

RESULTS

We studied 12 polymorphisms in eight candidate genes for ADHD that encode proteins involved in dopaminergic and noradrenergic neurotransmission (*DRD4*, *DAT1/SLC6A3*, *COMT*, and *ADRA2A*), enzymes involved in the pharmacokinetics of methylphenidate or atomoxetine (*CES1* and *CYP2D6*, respectively), Latrophilin 3 (*LPHN3*) and the Opioid receptor Mu 1 (*OPRM1*). Of the 12 polymorphisms initially selected for inclusion in the genotyping assay, one was monomorphic in our sample (rs121912777 in *CES1*), which resulted in 11 polymorphisms in seven candidate genes finally considered in a total sample of 604 adults with ADHD and 611 controls. No significant departures from HWE were identified in the control sample and, taking into account the sequence variant with the lowest MAF (0.166), the sample showed a minimum statistical power of 89%.

The case-control association study between ADHD and single markers revealed significant differences for the two *DRD4* polymorphisms, with the L allele of the Dup 120bp polymorphism ($P_{\text{codominant}} = 0.04$) (Supplementary Table S1A) and the 7R allele of the VNTR 48bp being nominally associated with adult ADHD ($P_{\text{dominant}} = 0.026$) (Table IA). A more detailed analysis of common alleles of the VNTR 48bp showed evidence for overrepresentation of the 7R allele in the clinical sample ($P_{7R} = 4.6e-03$; OR = 1.37 (1.11–1.69)) (Table IB). We subsequently considered *DRD4* for the haplotype-based analysis and detected an association between the Dup 120bp - VNTR 48bp haplotype and adult ADHD ($P_{\text{global-haplogenotypes}} = 0.008$ and $P_{\text{global-haplotype}} = 0.046$, Table IIA), with overrepresentation of the L-7R allelic combination and increased frequency of carriers of this risk haplotype in the ADHD group ($P_{\text{carriersL-7R}} = 0.017$; OR = 1.36 (1.06–1.75)) (Table IIB). Although not reaching significance, the analysis of an age-matched subsample of 122 ADHD adults and 122 unrelated controls also showed an overrepresentation of L-7R carriers among the cases (cases: 42%, controls: 34%; $P = 0.23$). No significant differences were observed for any of the other sequence variants considered in *DAT1/SLC6A3*, *COMT*, *ADRA2A*, *CYP2D6*, *LPHN3*, or *OPRM1* (Supplementary Table S1).

Under the hypothesis that *DRD4* is directly involved in ADHD, but may also modulate the dopaminergic response to stressful events, we subsequently tested potential gene-by-environment (GxE) interactions on ADHD severity. Participants were assessed for the severity of ADHD, as well as hyperactive and inattentive subscales, according to the ADHD-RS [DuPaul, 1998]. Sixty-five percent of participants had experienced stressful life events (23%

TABLE I. (A) Genotype and Allelic Distribution of the *DRD4* VNTR 48bp Polymorphism and (B) Comparison of Carriers of Common Genotypes and Alleles of the *DRD4* VNTR 48bp Polymorphism

(A)	Genotype					Allele			Sum	7R (16.3)	Sum
	Others ^a	2R4R	4R4R	4R7R	Sum	2R	4R	7R			
Controls N (%)	87 (15.9%)	76 (13.9%)	259 (47.3%)	125 (22.9%)	547	102 (9.3)	759 (69.4)	178 (16.3)	1,094		
Cases N (%)	114 (20.2%)	70 (12.4%)	232 (41.1%)	149 (26.4%)	565	113 (10)	724 (64.1)	237 (21)	1,130		
Sum	202 (18.1%)	146 (13.1%)	491 (44.1%)	274 (24.6%)	1,112	215 (9.7)	1,483 (66.7)	415 (18.7)	2,224		
(B)	Cases N (%)				Controls N (%)				P-value	OR (IC 95%)	
Genotype	Carriers	Non Carriers	Carriers	Non Carriers	Carriers	Non Carriers	Carriers	Non Carriers			
2R4R	70 (12.4)	495 (87.6)	76 (13.9)	471 (86.1)	—	—	—	—	—		
4R4R	232 (41.1)	333 (58.9)	259 (47.3)	288 (52.7)	0.04	1.29 (1.01–1.31)	—	—	—		
4R7R	149 (26.4)	416 (73.6)	125 (22.9)	422 (77.1)	—	—	—	—	—		
Allele											
2R	113 (10)	1,017 (90)	102 (9.3)	992 (90.7)	—	—	—	—	—		
4R	724 (64.1)	406 (35.9)	759 (69.4)	335 (30.6)	8.0e-03	1.27 (1.06–1.51)	—	—	—		
7R	237 (21)	893 (79)	178 (16.3)	916 (83.7)	5.0e-05	1.37 (1.09–1.69) ^c	—	—	—		

^aOthers: genotypes or alleles with frequency <5%, P-value = 0.06.

^bOthers: genotypes or alleles with frequency <5%, P-value = 0.026.

^cWhen OR <1 inverted score is shown.

TABLE II. (A) Haplotype Distribution of the *DRD4* Gene Dup 120bp and the VNTR 48bp Polymorphisms in a Sample of 561 Adult ADHD Subjects and 547 Controls and (B) Comparison of Frequency of Carriers of Common Haplotypes Between Cases and Controls

(A)	Haplogenotype distribution N (%)								Haplotype distribution N (%)					
	(L-2R)/(L-4R)	(S-2R)/(L-4R)	(L-4R)/(L-4R)	(L-4R)/(S-4R)	(L-4R)/(L-7R)	(S-4R)/(L-7R)	Others ^a	Sum	S-2R	S-4R	L-4R	L-7R	Others ^b	Sum
Controls	26 (4.8)	46 (8.4)	150 (27.4)	98 (17.9)	88 (16.1)	37 (6.8)	102 (18.6)	547	64 (5.9)	175 (16)	584 (53.4)	176 (16.1)	95 (8.7)	1,094
Cases	33 (5.9)	28 (5.0)	153 (27.3)	68 (12.1)	106 (18.9)	36 (6.4)	137 (24.4)	561	62 (5.5)	151 (13.5)	568 (50.6)	222 (19.8)	119 (10.6)	1,122
(B)	Cases N (%)								Controls N (%)					
	Carriers	Non Carriers	Sum	Carriers	Non Carriers	Sum	P-value	OR (IC 95%)						
S-2R	59 (10.5)	502 (89.5)	561	63 (11.5)	484 (88.5)	547	—	—						
S-4R	141 (25.1)	420 (74.9)	561	164 (30)	383 (70)	547	—	—						
L-4R	415 (74)	146 (26)	561	434 (74)	113 (20.7)	547	0.039	1.31 (1.02–1.79)						
L-7R	200 (35.7)	361 (64.3)	561	111 (20.3)	436 (79.7)	547	0.017	1.36 (1.06–1.76)						

^aOthers: genotypes or alleles with frequency <5%, P-value = 0.008.

^bOthers: genotypes or alleles with frequency <5%, P-value = 0.046.

had experienced one event, 13% had experienced two events, and 29% had experienced three or more events). Positive correlations were identified between the number of stressful life events and the severity of ADHD ($r = 0.23$, $P = 1.4e-06$), hyperactive ($r = 0.22$, $P = 4.3e-06$) and inattentive ($r = 0.172$, $P = 3.7e-04$) symptoms. Subjects with higher severity scores had been exposed more frequently to stressful life events than those with lower scores (ADHD: $F = 16.8$, $P = 5.1e-05$; hyperactivity: $F = 13.0$, $P = 3.5e-04$; inattention: $F = 11.4$, $P = 1.0e-03$). When stressful life events were considered separately, significant differences in overall ADHD severity were observed for sexual abuse ($P = 6.0e-03$), physical abuse ($P = 2.2e-06$), emotional abuse ($P = 5.0e-07$), domestic violence ($P = 4.3e-05$), extreme family stress ($P = 4.2e-04$), financial stress and poverty ($P = 1.7e-03$), and exposure to heavy metals ($P = 0.018$) (Fig. 1).

Given the impact of an adverse environment on ADHD severity, we subsequently investigated whether the interaction of *DRD4* with stressful life events moderates the effects of environmental factors on the ADHD phenotype. No significant differences in the number of stressful life events were observed between carriers and non carriers of the Dup 120-bp (L) variant, the VNTR 48bp (7R) variant or the Dup 120bp (L) - VNTR 48bp (7R) haplotype. No GxE interactions on the overall ADHD severity or on the hyperactive symptoms were detected when we considered the number of stressful life events and the *DRD4* variants (Supplementary Tables S2A and B). Regarding inattention scores, no significance was detected when we evaluated the two *DRD4* variants separately, but it rendered significant results when we considered stressful life events ($P = 3.6e-05$) or the interaction between the Dup 120bp (L) - VNTR 48bp (7R) haplotype and the number of stressful life events ($P = 0.031$) (Table III). There were no significant main effects on inattention symptoms for the Dup 120bp (L) - VNTR 48bp (7R) haplotype ($P = 0.4$). The effect of the number of stressful life events on inattention scores was stronger among subjects who do not carry the L-7R haplotype. ADHD-affected subjects carrying the L-7R haplotype who experienced stressful life events had lower scores in inattentive symptoms than non carriers (Table III and Fig. 2A). This significant interaction showed that stress positively predicted inattention symptoms among non carriers ($b = 2.3$, $SE = 0.5$, $t = 4.6$, $P = 7.6e-06$) and L-7R heterozygotes ($b = 1.3$, $SE = 0.7$, $t = 2.0$, $P = 0.045$), but not in the group of L-7R homozygotes ($b = 1.2$, $SE = 1.9$, $t = 0.6$, $P = 0.55$).

DISCUSSION

We aimed to perform a case-control association study on adult ADHD by focusing on eight classical candidate genes for the disorder, and to further examine the impact of their interaction with stressful life events on the severity of ADHD symptoms. Our results provide evidence for (i) the contribution of *DRD4* to adult ADHD; (ii) a main effect of experienced stressful life events on the severity of ADHD symptomatology; and (iii) a gene-by-environment interaction on the severity of inattention symptoms, in which the individual response to adverse life events may be modulated by *DRD4* genotypes.

Based on previous genetic studies, we considered two functional polymorphisms in *DRD4*: a 120bp duplication in the promoter

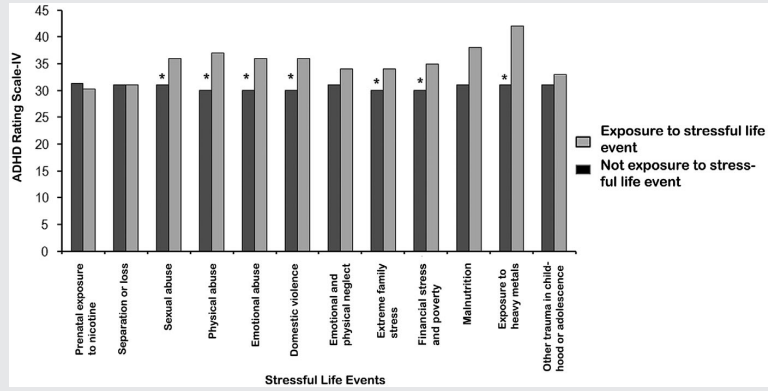


FIG. 1. ADHD Rating scale-IV scores in ADHD subjects according to the presence or absence of stressful life events; * significant difference (P-value < 0.05).

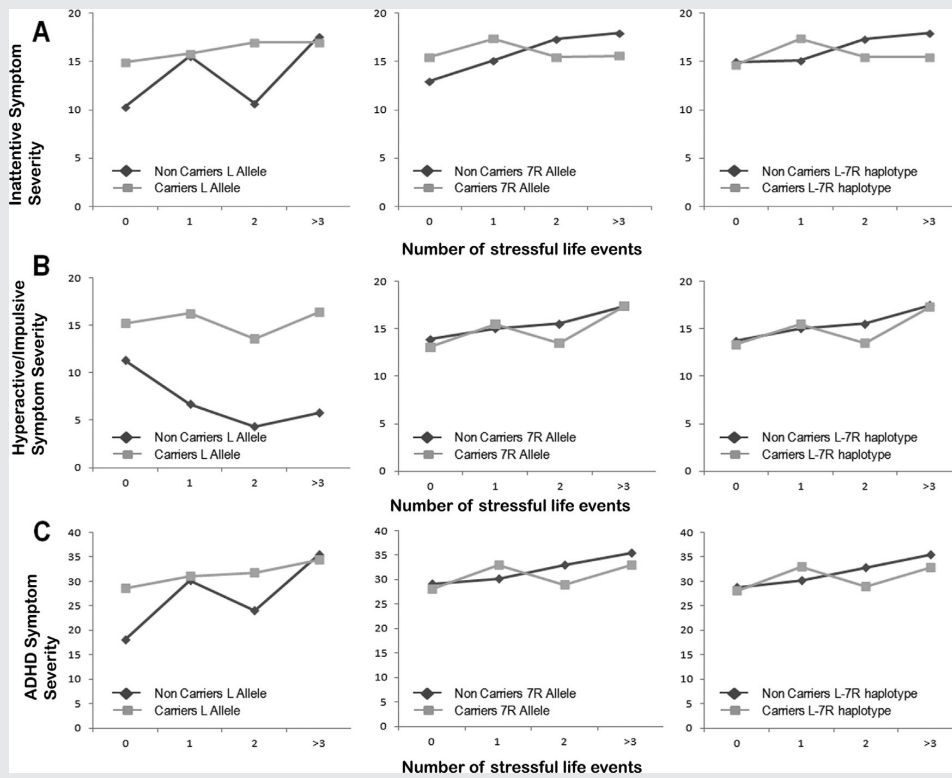


FIG. 2. Association between the number of stressful life events and ADHD symptom severity measured with the ADHD Rating Scale IV as a function of carriers of the Dup 120bp (L) allele, the VNTR 48bp (7R) allele or the L-7R haplotype in DRD4. (A) Inattentive symptom severity; (B) hyperactive-impulsive symptom severity; (C) ADHD symptom severity.

TABLE III. Results of Multiple Regression Analyses Estimating the GxE Interaction Between Carriers of the *DRD4* Risk Variants and Stressful Life Events in Inattentive Symptom Severity in 425 Adults With ADHD

	Predictor variables												
	Intercept			Stressful life events			DRD4			GxE interaction			
	β	SE	t	β	SE	t	β	SE	t	β	SE	t	P-value
Inattentive symptoms													
Dup 120bp polymorphism	11.967	1.139	1.398	1.592	1.139	1.398	0.163	0.163	1.407	3.069	2.18	1.407	0.16
L allele carriers vs. non carriers													0.449
VNTR 48bp polymorphism	14.793	0.261	3.932	1.025	0.261	3.932	9.86e ⁻⁵	9.86e ⁻⁵	0.449	0.344	0.765	0.449	0.653
7R allele carriers vs. non carriers													0.073
Dup 120bp - VNTR 48bp haplotype	14.689	0.258	4.174	1.078	0.258	4.174	3.63e ⁻⁵	3.63e ⁻⁵	0.825	0.634	0.768	0.825	0.41
L/7R carriers vs. non carriers													0.031

region, and a VNTR 48bp in exon 3. We found evidence for nominal association between the L and 7R alleles, as well as the L-7R allelic combination and persistent ADHD. Many association studies have evaluated the role of *DRD4* in ADHD and show divergent results [Frank et al., 2004; Bellgrove et al., 2005; Bakker et al., 2005; Brookes et al., 2005; Bhaduri et al., 2006; Kieling et al., 2006; Gornik et al., 2007; Shaw et al., 2007; Johnson et al., 2008; Altink et al., 2008; Nikolaidis and Gray, 2010; Smith, 2010; Sánchez-Mora et al., 2011; Bidwell et al., 2011; Tovo-Rodrigues et al., 2012; Tovo-Rodrigues et al., 2013; Hasler et al., 2015]. In agreement with our findings, some of these studies reported an association between the L or 7R variants and childhood ADHD [Faraone et al., 2001; El-Faddagh et al., 2004; Gornick et al., 2007; Gabriela et al., 2009], which suggests common susceptibility factors for ADHD both in children and adults, and supports the continuity of the disorder across the lifespan. Other studies, however, identified opposite ADHD risk variants or found a lack of association between *DRD4* and ADHD, which indicates that the involvement of genetic variants in *DRD4* in this neuropsychiatric disorder is less straightforward than expected [Bakker et al., 2005; Sánchez-Mora et al., 2011]. In this regard, the previous meta-analysis performed by our research group highlighted the L-4R haplotype, instead of the L-7R, as a risk variant for combined ADHD [Sánchez-Mora et al., 2011]. These inconsistent results between studies might be related with the modulatory role that *DRD4* may exert in mediating the effects of life stress exposures on ADHD symptoms, with specific allele combinations being more vulnerable to environmental adversity. Additional explanations for divergent results could be the limited overlap between the two studies, the subtype-specific association observed in the previous meta-analysis, and differential LD distribution across populations.

Gene-by-environmental interactions might be particularly relevant in ADHD, where symptom severity is influenced by environmental risk factors, such as prenatal exposure to nicotine, family adversity, parental ADHD, inter-parental conflict, parenting styles or childhood maltreatment [Linnet et al., 2005; Schmitz et al., 2006; Banerjee et al., 2007; Ellis and Nigg 2009; Nigg et al., 2010; Freitag et al., 2012; Caye et al., 2013]. Therefore, we explored the potential impact of adverse life events on ADHD severity and found evidence of the effect of stressful life events, including sexual and physical abuse, emotional abuse, domestic violence, extreme family stress, financial stress and poverty or exposure to heavy metals, on higher severity of inattentive and hyperactive symptoms in a large clinical sample of adults with ADHD. We then hypothesized that the influence of stressful experiences across the lifespan on ADHD may be modulated by the genetic background. As previously described in other psychiatric conditions such as depression, the risk of ADHD after a stressful event may be higher among genetically susceptible subjects than among those at low genetic risk [Caspi et al., 2003]. Although no differences in the severity of ADHD symptoms were found between carriers and non carriers of the studied *DRD4* genetic variants, we found evidence for gene-by-environmental interactions. Our results suggest that *DRD4* may moderate the effect of adverse life events on ADHD severity, as non carriers of the L-7R haplotype who experienced stressful life events had more inattentive symptoms than those carrying this allelic combination. The protective effect of the 7R allele at *DRD4* agrees

with previous reports showing an association between this variant and lower scores of ADHD symptoms on the Conners' scales, a milder form of ADHD, and better neuropsychological function and clinical outcome [Bellgrove et al., 2005; Gornick et al., 2007; Shaw et al., 2007; Altink et al., 2008; Boonstra et al., 2008]. In addition, the 7R allele variant was previously related to the effect of adverse experience, such as stress exposure during prenatal life, or aggression in adulthood [Bakermans-Kranenburg and van Ijzendoorn, 2006; Berry et al., 2013; Dilalla et al., 2013; Buchmann et al., 2014].

Our results should be viewed in the context of some limitations. First, since statistical power is a critical issue in GxE studies, we minimized the number of comparisons performed by applying a conservative statistical approach and restricting the analysis of GxE only to genes that showed evidence of association with ADHD in the case-control study. Therefore, we cannot rule out having missed genes other than *DRD4* that contribute to mediating the effect of stressful life events on ADHD symptoms. In addition, since no corrections for multiple testing were applied, all results should be considered as nominal associations. Second, further studies in larger age-matched samples are required to elucidate the effect of age at assessment on ADHD symptomatology. However, age differences between cases and controls may not represent a major issue in the present study since, in addition to the assessment of ADHD in adulthood, DSM-IV ADHD symptoms in childhood were retrospectively excluded in the control group. Thirdly, the retrospective ascertainment of adverse life events should be considered particularly important in the interpretation of the results, since retrospective recall measures may undercount such events and, therefore, result in inaccurate reports [Moffit et al., 2010]. Further studies using prospective methods may be more representative of lifetime stressful exposure and will provide insight into *DRD4* involvement in the modulation of environmental influences.

Under the hypothesis that specific genes modulate the effect of environmental factors on ADHD and that these gene-environmental interactions may be responsible for some of the inconsistent findings in genetic association studies, other candidate genes, in addition to *DRD4*, have been evaluated in ADHD subjects by other authors. Interaction between the serotonin transporter *5HTT* and stress on ADHD severity has been described, where carriers of the short allele of the *5HTT-LPR* polymorphism are more sensitive to stress and environment adversity than homozygotes for the long allele [Muller et al., 2008; Retz et al., 2008; van der Meer et al., 2014]. In addition, interactions between *MAOA* and negative parenting or *DAT1/SLC6A3* and psychosocial adversity have been identified that increase ADHD symptoms [Laucht et al., 2007; Stevens et al., 2009; Li and Lee 2012], which also supports the role of gene-by-environment interactions in the etiology of ADHD.

In summary, we have identified a tentative association between ADHD and *DRD4* and found preliminary evidence for the contribution of *DRD4* in the modulation of the effect of stressful life events on the inattentive dimension of the disorder. These results strengthen the hypothesis of gene-by-environmental interactions on the severity of ADHD, may explain discrepancies in previous genetic studies that investigate the relationship between ADHD

and *DRD4*, and emphasize the need to include stressful life experiences in further genetic studies.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to all the patients and their families for their kind participation. We thank the clinical collaborators who contributed to the diagnosis of the probands.

REFERENCES

- Altink ME, Arias-Vasquez A, Franke B, Slaats-Willemse DI, Buschgens CJ, Rommelse NN, Fliers EA, Anney R, Brookes KJ, Chen W, et al. 2008. The dopamine receptor D4 7-repeat allele and prenatal smoking in ADHD-affected children and their unaffected siblings: No gene-environment interaction. *J Child Psychol Psychiatry* 49(10):1053–1060.
- Arcos-Burgos M, Jain M, Acosta MT, Shively S, Stanescu H, Wallis D, Domene S, Velez JI, Karkera JD, Balog J, et al. 2010. A common variant of the latrophilin 3 gene, LPHN3, confers susceptibility to ADHD and predicts effectiveness of stimulant medication. *Mol Psychiatry* 15(11):1053–1066.
- Asghari V, Sanyal S, Buchwaldt S, Paterson A, Jovanovic V, Van Tol HH. 1995. Modulation of intracellular cyclic AMP levels by different human dopamine D4 receptor variants. *J Neurochem* 65(3):1157–1165.
- Bakermans-Kranenburg MJ, van Ijzendoorn MH. 2006. Gene-environment interaction of the dopamine D4 receptor (*DRD4*) and observed maternal insensitivity predicting externalizing behavior in preschoolers. *Dev Psychobiol* 48(5):406–409.
- Bakker SC, van der Meulen EM, Oteman N, Schelleman H, Pearson PL, Buitelaar JK, Sinke RJ. 2005. *DAT1*, *DRD4*, and *DRD5* polymorphisms are not associated with ADHD in Dutch families. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 132B(1):50–52.
- Banerjee TD, Middleton F, Faraone SV. 2007. Environmental risk factors for attention-deficit hyperactivity disorder. *Acta Paediatr* 96(9):1269–1274.
- Barr CL, Feng Y, Wigg KG, Schachar R, Tannock R, Roberts W, Malone M, Kennedy JL. 2001. 5'-untranslated region of the dopamine D4 receptor gene and attention-deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet* 105(1):84–90.
- Bellgrove MA, Hawi Z, Lowe N, Kirley A, Robertson IH, Gill M. 2005. *DRD4* gene variants and sustained attention in attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): Effects of associated alleles at the VNTR and 521 SNP. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 136B(1): 81–86.
- Berry MR, Robinson C, Karet Frankl FE. 2013. Unexpected clinical sequelae of Gitelman syndrome: Hypertension in adulthood is common and females have higher potassium requirements. *Nephrol Dial Transplant* 28(6):1533–1542.
- Bhaduri N, Das M, Sinha S, Chattopadhyay A, Gangopadhyay PK, Chaudhuri K, Singh M, Mukhopadhyay K. 2006. Association of dopamine D4 receptor (*DRD4*) polymorphisms with attention deficit hyperactivity disorder in Indian population. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 141B(1):61–66.
- Bidwell LC, Willcutt EG, McQueen MB, DeFries JC, Olson RK, Smith SD, Pennington BF. 2011. A family based association study of *DRD4*, *DAT1*, and *5HTT* and continuous traits of attention-deficit hyperactivity disorder. *Behav Genet* 41(1):165–174.
- Bonnet U. 2003. Moclobemide: Therapeutic use and clinical studies. *CNS Drug Rev* 9(1):97–140.

- Boonstra AM, Kooij JJ, Buitelaar JK, Oosterlaan J, Sergeant JA, Heister JG, Franke B. 2008. An exploratory study of the relationship between four candidate genes and neurocognitive performance in adult ADHD. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 147B(3):397–402.
- Brookes KJ, Knight J, Xu X, Asherson P. 2005. DNA pooling analysis of ADHD and genes regulating vesicle release of neurotransmitters. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 139B(1):33–37.
- Brookes KJ, Mill J, Guindalini C, Curran S, Xu X, Knight J, Chen CK, Huang YS, Sethna V, Taylor E, et al. 2006a. A common haplotype of the dopamine transporter gene associated with attention-deficit/hyperactivity disorder and interacting with maternal use of alcohol during pregnancy. *Arch Gen Psychiatry* 63(1):74–81.
- Brookes KJ, Mill J, Guindalini C, Curran S, Xu X, Knight J, Chen CK, Huang YS, Sethna V, Taylor E, et al. 2006b. A common haplotype of the dopamine transporter gene associated with attention-deficit/hyperactivity disorder and interacting with maternal use of alcohol during pregnancy. *Arch Gen Psychiatry* 63(1):74–81.
- Buchmann AF, Zohsel K, Blomeyer D, Hohm E, Hohmann S, Jennen-Steinmetz C, Treutlein J, Becker K, Banaschewski T, Schmidt MH, et al. 2014. Interaction between prenatal stress and dopamine D4 receptor genotype in predicting aggression and cortisol levels in young adults. *Psychopharmacology (Berl)* 231(16):3089–3097.
- Buitelaar JK. 2005. ADHD: Strategies to unravel its genetic architecture. *J Neural Transm Suppl* (69):1–17.
- Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, et al. 2003. Influence of life stress on depression: Moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 301(5631):386–389.
- Castro T, Mateus HE, Fonseca DJ, Forero D, Restrepo CM, Talero C, Velez A, Laissue P. 2013. Sequence analysis of the ADRA2A coding region in children affected by attention deficit hyperactivity disorder. *Neurol Sci* 34(12):2219–2222.
- Caye A, Machado JD, Rohde LA. 2013. Evaluating parental disagreement in ADHD diagnosis: Can we rely on a single report from home? *J Atten Disord*.
- Contini V, Victor MM, Cerqueira CC, Polina ER, Grevet EH, Salgado CA, Karam RG, Vitola ES, Belmonte-de-Abreu P, Bau CH. 2011. Adrenergic alpha2A receptor gene is not associated with methylphenidate response in adults with ADHD. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 261(3):205–211.
- Choi CI, Bae JW, Lee YJ, Lee HI, Jang CG, Lee SY. 2014. Effects of CYP2C19 genetic polymorphisms on atomoxetine pharmacokinetics. *J Clin Psychopharmacol* 34(1):139–142.
- da Silva N Jr., Szobot CM, Anselmi CE, Jackowski AP, Chi SM, Hoexter MQ, Anselmi OE, Pechansky F, Bressan RA, Rohde LA. 2011. Attention deficit/hyperactivity disorder: Is there a correlation between dopamine transporter density and cerebral blood flow? *Clin Nucl Med* 36(8):656–660.
- de Azeredo LA, Rovaris DL, Mota NR, Polina ER, Marques FZ, Contini V, Vitola ES, Belmonte-de-Abreu P, Rohde LA, Grevet EH, et al. 2014. Further evidence for the association between a polymorphism in the promoter region of SLC6A3/DAT1 and ADHD: Findings from a sample of adults. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 264(5):401–408.
- de Cerqueira CC, Polina ER, Contini V, Marques FZ, Grevet EH, Salgado CA, da Silva PO, Picon FA, Belmonte-de-Abreu P, Bau CH. 2011. ADRA2A polymorphisms and ADHD in adults: Possible mediating effect of personality. *Psychiatry Res* 186(2-3):345–350.
- De Sanctis VA, Nomura Y, Newcorn JH, Halperin JM. 2012. Childhood maltreatment and conduct disorder: Independent predictors of criminal outcomes in ADHD youth. *Child Abuse Negl* 36(11-12):782–789.
- Dilalla LF, Gheyara S, Bersted K. 2013. The Southern Illinois twins and siblings study (SITSS): Description and update. *Twin Res Hum Genet* 16(1):371–375.
- DuPaul GJ, Power TJ, Anastopoulos AD, Reid R. 1998. ADHD Rating Scale—IV: Checklists, norms, and clinical interpretation. New York: Guilford Press viii. p 79.
- D'Souza UM, Russ C, Tahir E, Mill J, McGuffin P, Asherson PJ, Craig IW. 2004. Functional effects of a tandem duplication polymorphism in the 5' flanking region of the DRD4 gene. *Biol Psychiatry* 56(9):691–697.
- El-Faddagh M, Laucht M, Maras A, Vohringer L, Schmidt MH. 2004. Association of dopamine D4 receptor (DRD4) gene with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) in a high-risk community sample: A longitudinal study from birth to 11 years of age. *J Neural Transm* 111(7):883–889.
- Ellis B, Nigg J. 2009. Parenting practices and attention-deficit/hyperactivity disorder: New findings suggest partial specificity of effects. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 48(2):146–154.
- Faraone SV, Doyle AE, Mick E, Biederman J. 2001. Meta-analysis of the association between the 7-repeat allele of the dopamine D(4) receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* 158(7):1052–1057.
- Faraone SV, Mick E. 2010. Molecular genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr Clin North Am* 33(1):159–180.
- Frank Y, Pergolizzi RG, Perilla MJ. 2004. Dopamine D4 receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Pediatr Neurol* 31(5):345–348.
- Franke B, Hoogman M, Arias Vasquez A, Heister JG, Savelkoul PJ, Naber M, Scheffer H, Kiemeny LA, Kan CC, Kooij JJ, et al. 2008. Association of the dopamine transporter (SLC6A3/DAT1) gene 9–6 haplotype with adult ADHD. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 147B(8):1576–1579.
- Franke B, Neale BM, Faraone SV. 2009. Genome-wide association studies in ADHD. *Hum Genet* 126(1):13–50.
- Franke B, Vasquez AA, Johansson S, Hoogman M, Romanos J, Boreatti-Hummer A, Heine M, Jacob CP, Lesch KP, Casas M, et al. 2010. Multicenter analysis of the SLC6A3/DAT1 VNTR haplotype in persistent ADHD suggests differential involvement of the gene in childhood and persistent ADHD. *Neuropsychopharmacology* 35(3):656–664.
- Freitag CM, Hanig S, Schneider A, Seitz C, Palmason H, Retz W, Meyer J. 2012. Biological and psychosocial environmental risk factors influence symptom severity and psychiatric comorbidity in children with ADHD. *J Neural Transm* 119(1):81–94.
- Froehlich TE, McGough JJ, Stein MA. 2010. Progress and promise of attention-deficit hyperactivity disorder pharmacogenetics. *CNS Drugs* 24(2):99–117.
- Gabriela ML, John DG, Magdalena BV, Ariadna GS, Francisco de LP, Liz SM, Lino PC, Josefina RG, Ernesto RZ, Carlos CF. 2009. Genetic interaction analysis for DRD4 and DAT1 genes in a group of Mexican ADHD patients. *Neurosci Lett* 451(3):257–260.
- Gizer IR, Ficks C, Waldman ID. 2009. Candidate gene studies of ADHD: A meta-analytic review. *Hum Genet* 126(1):51–90.
- Gonzalez JR, Armengol L, Sole X, Guino E, Mercader JM, Estivill X, Moreno V. 2007. SNPAssoc: An R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* 23(5):644–645.
- Gornick MC, Addington A, Shaw P, Bobb AJ, Sharp W, Greenstein D, Arepalli S, Castellanos FX, Rapoport JL. 2007. Association of the dopamine receptor D4 (DRD4) gene 7-repeat allele with children with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): An update. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 144B(3):379–382.

- Gothelf D, Michaelovsky E, Frisch A, Zohar AH, Presburger G, Burg M, Aviram-Goldring A, Frydman M, Yeshaya J, Shohat M, et al. 2007. Association of the low-activity COMT 158Met allele with ADHD and OCD in subjects with velocardiofacial syndrome. *Int J Neuropsychopharmacol* 10(3):301–308.
- Halleland H, Lundervold AJ, Halmoy A, Haavik J, Johansson S. 2009. Association between catechol O-methyltransferase (COMT) haplotypes and severity of hyperactivity symptoms in adults. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 150B(3):403–410.
- Han JY, Kwon HJ, Ha M, Paik KC, Lim MH, Gyu Lee S, Yoo SJ, Kim EJ. 2015. The effects of prenatal exposure to alcohol and environmental tobacco smoke on risk for ADHD: A large population-based study. *Psychiatry Res* 225(1-2):164–168.
- Hasler R, Salzmann A, Bolzan T, Zimmermann J, Baud P, Giannakopoulos P, Perroud N. 2015. DAT1 and DRD4 genes involved in key dimensions of adult ADHD. *Neurol Sci*.
- Hinney A, Scherag A, Jarick I, Albayrak O, Putter C, Pechlivanis S, et al. 2011. Genome-wide association study in German patients with attention deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 156B:888–897.
- Hong SB, Zalesky A, Park S, Yang YH, Park MH, Kim B, Song IC, Sohn CH, Shin MS, Kim BN, et al. 2014. COMT genotype affects brain white matter pathways in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Hum Brain Mapp* 36(1):367–377.
- Hudziak JJ, Derks EM, Althoff RR, Rettew DC, Boomsma DI. 2005. The genetic and environmental contributions to attention deficit hyperactivity disorder as measured by the Conners' Rating Scales-Revised. *Am J Psychiatry* 162(9):1614–1620.
- Johansson S, Halleland H, Halmoy A, Jacobsen KK, Landaas ET, Dramsdahl M, Fasmer OB, Bergsholm P, Lundervold AJ, Gillberg C, et al. 2008. Genetic analyses of dopamine related genes in adult ADHD patients suggest an association with the DRD5-microsatellite repeat, but not with DRD4 or SLC6A3 VNTRs. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 147B(8):1470–1475.
- Johnson KA, Kelly SP, Robertson IH, Barry E, Mulligan A, Daly M, Lambert D, McDonnell C, Connor TJ, Hawi Z, et al. 2008. Absence of the 7-repeat variant of the DRD4 VNTR is associated with drifting sustained attention in children with ADHD but not in controls. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 147B(6):927–937.
- Johnson KA, Barry E, Lambert D, Fitzgerald M, McNicholas F, Kirley A, Gill M, Bellgrove MA, Hawi Z. 2013. Methylphenidate side effect profile is influenced by genetic variation in the attention-deficit/hyperactivity disorder-associated CES1 gene. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 23(10):655–664.
- Kereszturi E, Kiraly O, Csapo Z, Tarnok Z, Gadoros J, Sasvari-Szekely M, Nemoda Z. 2007. Association between the 120-bp duplication of the dopamine D4 receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder: Genetic and molecular analyses. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 144B(2):231–236.
- Kessler RC, Adler LA, Barkley R, Biederman J, Conners CK, Faraone SV, Greenhill LL, Jaeger S, Secnik K, Spencer T, et al. 2005. Patterns and predictors of attention-deficit/hyperactivity disorder persistence into adulthood: Results from the national comorbidity survey replication. *Biol Psychiatry* 57(11):1442–1451.
- Kieling C, Roman T, Doyle AE, Hutz MH, Rohde LA. 2006. Association between DRD4 gene and performance of children with ADHD in a test of sustained attention. *Biol Psychiatry* 60(10):1163–1165.
- Kotte A, Faraone SV, Biederman J. 2013. Association of genetic risk severity with ADHD clinical characteristics. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 162B(7):718–733.
- Kovess V, Keyes KM, Hamilton A, Pez O, Bitfoi A, Koc C, Goelitz D, Kuijpers R, Lesinskiene S, Mihova Z, et al. 2014. Maternal smoking and offspring inattention and hyperactivity: Results from a cross-national European survey. *Eur Child Adolesc Psychiatry*.
- Kumsta R, Stevens S, Brookes K, Schlotz W, Castle J, Beckett C, Kreppner J, Rutter M, Sonuga-Barke E. 2010. 5HTT genotype moderates the influence of early institutional deprivation on emotional problems in adolescence: Evidence from the English and Romanian Adoptee (ERA) study. *J Child Psychol Psychiatry* 51(7):755–762.
- Langley K, Rice F, van den Bree MB, Thapar A. 2005. Maternal smoking during pregnancy as an environmental risk factor for attention deficit hyperactivity disorder behaviour. A review. *Minerva Pediatr* 57(6):359–371.
- Langley K, Heron J, Smith GD, Thapar A. 2012. Maternal and paternal smoking during pregnancy and risk of ADHD symptoms in offspring: Testing for intrauterine effects. *Am J Epidemiol* 176(3):261–268.
- Lasky-Su J, Anney RJ, Neale BM, Franke B, Zhou K, Maller JB, et al. 2008a. Genome-wide association scan of the time to onset of attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 147B(8):1355–1358.
- Lasky-Su J, Neale BM, Franke B, Anney RJ, Zhou K, Maller JB, et al. 2008b. Genome-wide association scan of quantitative traits for attention deficit hyperactivity disorder identifies novel associations and confirms candidate gene associations. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 147B:1345–1354.
- Laucht M, Skowronek MH, Becker K, Schmidt MH, Esser G, Schulze TG, Rietschel M. 2007. Interacting effects of the dopamine transporter gene and psychosocial adversity on attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms among 15-year-olds from a high-risk community sample. *Arch Gen Psychiatry* 64(5):585–590.
- Lee SH and Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium. 2013. Genetic relationship between five psychiatric disorders estimated from genome-wide SNPs. *Nat Genet* 45(9):984–994.
- Lee YH, Song GG. 2015. BDNF 196 G/A and COMT Val158Met polymorphisms and susceptibility to ADHD: A meta-analysis. *J Atten Disord*.
- Lesch KP, Timmesfeld N, Renner TJ, Halperin R, Roser C, Nguyen TT, et al. 2008. Molecular genetics of adult ADHD: Converging evidence from genome-wide association and extended pedigree linkage studies. *J Neural Transm* 115:1573–1585.
- Lesch KP, Selch S, Renner TJ, Jacob C, Nguyen TT, Hahn T, et al. 2011. Genome-wide copy number variation analysis in attention-deficit/hyperactivity disorder: Association with neuropeptide Y gene dosage in an extended pedigree. *Mol Psychiatry* 16(5):491–503.
- Li JJ, Lee SS. 2012. Association of positive and negative parenting behavior with childhood ADHD: Interactions with offspring monoamine oxidase A (MAO-A) genotype. *J Abnorm Child Psychol* 40(2):165–175.
- Linnet KM, Wisborg K, Obel C, Secher NJ, Thomsen PH, Agerbo E, Henriksen TB. 2005. Smoking during pregnancy and the risk for hyperkinetic disorder in offspring. *Pediatrics* 116(2):462–467.
- McCracken JT, Badashova KK, Posey DJ, Aman MG, Scahill L, Tierney E, Arnold LE, Vitiello B, Whelan F, Chuang SZ, et al. 2014. Positive effects of methylphenidate on hyperactivity are moderated by monoaminergic gene variants in children with autism spectrum disorders. *Pharmacogenomics J* 14(3):295–302.
- Michelson D, Read HA, Ruff DD, Witcher J, Zhang S, McCracken J. 2007. CYP2D6 and clinical response to atomoxetine in children and adolescents with ADHD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 46(2):242–251.
- Mick E, Todorov A, Smalley S, Hu X, Loo S, Todd RD, et al. 2010. Family-based genome-wide association scan of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 49:898–905.e893.

- Moffitt TE, Caspi A, et al. 2010. How common are common mental disorders? Evidence that lifetime prevalence rates are doubled by prospective versus retrospective ascertainment. *Psychol Med* 40(6):899–909.
- Muller DJ, Mandelli L, Serretti A, DeYoung CG, De Luca V, Sicard T, Tharmalingam S, Gallinat J, Muglia P, De Ronchi D, et al. 2008. Serotonin transporter gene and adverse life events in adult ADHD. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 147B(8):1461–1469.
- Neale BM, Lasky-Su J, Anney R, Franke B, Zhou K, Maller JB, et al. 2008. Genome-wide association scan of attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 147B(8):1337–1344.
- Neale BM, Medland SE, Ripke S, Asherson P, Franke B, Lesch KP, et al. 2010. Meta-analysis of genome-wide association studies of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 49(9):884–897.
- Nemoda Z, Angyal N, Tarnok Z, Gadoros J, Sasvari-Szekely M. 2009. Carboxylesterase 1 gene polymorphism and methylphenidate response in ADHD. *Neuropharmacology* 57(7-8):731–733.
- Nigg JT, Nikolas M, Mark Knottnerus G, Cavanagh K, Friderici K. 2010. Confirmation and extension of association of blood lead with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and ADHD symptom domains at population-typical exposure levels. *J Child Psychol Psychiatry* 51(1):58–65.
- Nikolaidis A, Gray JR. 2010. ADHD and the DRD4 exon III 7-repeat polymorphism: An international meta-analysis. *Soc Cogn Affect Neurosci* 5(2–3):188–193.
- Ott J. 1985. A chi-square test to distinguish allelic association from other causes of phenotypic association between two loci. *Genet Epidemiol* 2:79–84.
- Paredes UM, Quinn JP, D'Souza UM. 2013. Allele-specific transcriptional activity of the variable number of tandem repeats in 5' region of the DRD4 gene is stimulus specific in human neuronal cells. *Genes Brain Behav* 12(2):282–287.
- Park S, Hong SB, Kim JW, Yang YH, Park MH, Kim BN, Shin MS, Yoo HJ, Cho SC. 2013. White-matter connectivity and methylphenidate-induced changes in attentional performance according to alpha2A-adrenergic receptor gene polymorphisms in Korean children with attention-deficit hyperactivity disorder. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 25(3):222–228.
- Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, Biederman J, Rohde LA. 2007. The worldwide prevalence of ADHD: A systematic review and meta-regression analysis. *Am J Psychiatry* 164(6):942–948.
- Prayez F, Wodon I, Van Hyfte S, Linkowski P. 2012. Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and child maltreatment: A review. *Rev Med Brux* 33(2):75–86.
- Retz W, Freitag CM, Retz-Junginger P, Wenzler D, Schneider M, Kissling C, Thome J, Rosler M. 2008. A functional serotonin transporter promoter gene polymorphism increases ADHD symptoms in delinquents: Interaction with adverse childhood environment. *Psychiatry Res* 158(2):123–131.
- Reuter M, Kirsch P, Hennig J. 2006. Inferring candidate genes for attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) assessed by the World Health Organization Adult ADHD Self-Report Scale (ASRS). *J Neural Transm* 113(7):929–938.
- Ribasés M, Ramos-Quiroga JA, Hervas A, Bosch R, Bielsa A, Gastaminza X, Artigas J, Rodriguez-Ben S, Estivill X, Casas M, et al. 2009. Exploration of 19 serotonergic candidate genes in adults and children with attention-deficit/hyperactivity disorder identifies association for 5HT2A, DDC and MAOB. *Mol Psychiatry* 14(1):71–85.
- Ribasés M, Ramos-Quiroga JA, Sánchez-Mora C, Bosch R, Richarte V, Palomar G, Gastaminza X, Bielsa A, Arcos-Burgos M, Muenke M, et al. 2011. Contribution of LPHN3 to the genetic susceptibility to ADHD in adulthood: A replication study. *Genes Brain Behav* 10(2):149–157.
- Sánchez-Mora C, Ribases M, Casas M, Bayes M, Bosch R, Fernandez-Castillo N, Brunso L, Jacobsen KK, Landaas ET, Lundervold AJ, et al. 2011. Exploring DRD4 and its interaction with SLC6A3 as possible risk factors for adult ADHD: A meta-analysis in four European populations. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 156B(5):600–612.
- Sánchez-Mora C, Cormand B, Ramos-Quiroga JA, Hervas A, Bosch R, Palomar G, Nogueira M, Gomez-Barros N, Richarte V, Corrales M, et al. 2013. Evaluation of common variants in 16 genes involved in the regulation of neurotransmitter release in ADHD. *Eur Neuropsychopharmacol* 23(6):426–435.
- Sánchez-Mora C, Ramos-Quiroga JA, Bosch R, Corrales M, Garcia-Martinez I, Nogueira M, et al. 2015. Case-control genome-wide association study of persistent attention-deficit hyperactivity disorder identifies FBXO33 as a novel susceptibility gene for the disorder. *Neuropsychopharmacology* 40(4):915–926.
- Schmitz M, Denardin D, Laufer Silva T, Pianca T, Hutz MH, Faraone S, Rohde LA. 2006. Smoking during pregnancy and attention-deficit/hyperactivity disorder, predominantly inattentive type: A case-control study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 45(11):1338–1345.
- Shaw P, Gornick M, Lerch J, Addington A, Seal J, Greenstein D, Sharp W, Evans A, Giedd JN, Castellanos FX, et al. 2007. Polymorphisms of the dopamine D4 receptor, clinical outcome, and cortical structure in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry* 64(8):921–931.
- Simon V, Czobor P, Balint S, Meszaros A, Bitter I. 2009. Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: Meta-analysis. *Br J Psychiatry* 194(3):204–211.
- Smith TF. 2010. Meta-analysis of the heterogeneity in association of DRD4 7-repeat allele and AD/HD: Stronger association with AD/HD combined type. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 153B(6):1189–1199.
- Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68(4):978–989.
- Stergiakouli E, Hamshere M, Holmans P, Langley K, Zaharieva I, Hawi Z, Kent L, Gill M, Williams N, Owen MJ, et al. 2012. Investigating the contribution of common genetic variants to the risk and pathogenesis of ADHD. *Am J Psychiatry* 169(2):186–194.
- Stevens SE, Kumsta R, Kreppner JM, Brookes KJ, Rutter M, Sonuga-Barke EJ. 2009. Dopamine transporter gene polymorphism moderates the effects of severe deprivation on ADHD symptoms: Developmental continuities in gene-environment interplay. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 150B(6):753–761.
- Todd RD, Neuman RJ. 2007. Gene-environment interactions in the development of combined type ADHD: Evidence for a synapse-based model. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 144B(8):971–975.
- Tong JH, Cummins TD, Johnson BP, McKinley LA, Pickering HE, Fanning P, Stefanac NR, Newman DP, Hawi Z, Bellgrove MA. 2015. An association between a dopamine transporter gene (SLC6A3) haplotype and ADHD symptom measures in nonclinical adults. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 168(2):89–96.
- Tovo-Rodrigues L, Rohde LA, Roman T, Schmitz M, Polanczyk G, Zeni C, Marques FZ, Contini V, Grevet EH, Belmonte-de-Abreu P, et al. 2012. Is there a role for rare variants in DRD4 gene in the susceptibility for ADHD? Searching for an effect of allelic heterogeneity. *Mol Psychiatry* 17(5):520–526.
- Tovo-Rodrigues L, Rohde LA, Menezes AM, Polanczyk GV, Kieling C, Genro JP, Anselmi L, Hutz MH. 2013. DRD4 rare variants in Attention-

- Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD): Further evidence from a birth cohort study. *PLoS ONE* 8(12):e85164.
- Trzepacz PT, Williams DW, Feldman PD, Wrishko RE, Witcher JW, Buitelaar JK. 2008. CYP2D6 metabolizer status and atomoxetine dosing in children and adolescents with ADHD. *Neuropsychopharmacol* 18(2):79–86.
- van der Meer D, Hartman CA, Richards J, Bralten JB, Franke B, Oosterlaan J, Heslenfeld DJ, Faraone SV, Buitelaar JK, Hoekstra PJ. 2014. The serotonin transporter gene polymorphism 5-HTTLPR moderates the effects of stress on attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Child Psychol Psychiatry* 55(12):1363–1371.
- Yang L, Neale BM, Liu L, Lee SH, Wray NR, Ji N, et al. 2013. Polygenic transmission and complex neuro developmental network for attention deficit hyperactivity disorder: Genome-wide association study of both common and rare variants. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 162B(5):419–430.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

2.2. Estudi 2. Farmacogenètica de la resposta i tolerabilitat al MPH en pacients infantils amb TDAH

2.2.1. Resum

El MPH és un potent inhibidor del transportador de dopamina àmpliament utilitzat per al tractament farmacològic del TDAH en nens i adolescents. No obstant això, existeix una considerable variabilitat interindividual en la resposta clínica, fet que podria estar determinat, entre d'altres, per influències genètiques. La present investigació estudià cinquanta-set SNP en nou gens candidats del sistema dopaminèrgic (*TH*, *DBH*, *COMT*, *DAT1* i *DRD1-5*) com a possibles predictors de l'eficàcia i la tolerabilitat al MPH. A continuació, es realitzà una anàlisi d'interaccions $G \times E$ en què es consideraren variables pre i perinatales com a factors de risc ambientals capaços d'influir en els efectes terapèutics del fàrmac. Els resultats obtinguts proporcionen evidències sobre la contribució de *DRD3*, *DBH*, *TH* i l'exposició prenatal al tabac en l'eficàcia clínica del MPH. En particular, s'observà un major risc de resistència al tractament en individus susceptibles genèticament i amb mares fumadores durant l'embaràs. A més, la presència d'efectes adversos s'associà de forma significativa a la variabilitat a *DBH* i *DRD2*. Aquest estudi suggereix que el sistema dopaminèrgic, juntament amb l'exposició prenatal a la nicotina, pot modificar els efectes del tractament amb MPH.

2.2.2. Referència

Pagerols, M., Richarte, V., Sánchez-Mora, C., Garcia-Martínez, I., Corrales, M., Corominas, M., ... Ramos-Quiroga, J. A. (2017). Pharmacogenetics of methylphenidate response and tolerability in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pharmacogenomics J*, 17 (1), 98-104.

ORIGINAL ARTICLE

Pharmacogenetics of methylphenidate response and tolerability in attention-deficit/hyperactivity disorder

M Pagerols^{1,2}, V Richarte², C Sánchez-Mora^{1,2,3}, I García-Martínez^{1,2}, M Corrales², M Corominas^{2,3}, B Cormand^{4,5,6}, M Casas^{2,3,7}, M Ribasés^{1,2,3} and JA Ramos-Quiroga^{2,3,7}

Methylphenidate (MPH) is the most frequently used pharmacological treatment in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. However, a considerable interindividual variability exists in clinical outcome, which may reflect underlying genetic influences. We analyzed 57 single-nucleotide polymorphisms in 9 dopamine-related candidate genes (*TH*, *DBH*, *COMT*, *DAT1* and *DRD1-5*) as potential predictors of MPH efficacy and tolerability, and we considered prenatal and perinatal risk factors as environmental hazards that may influence treatment effects in a gene-by-environment analysis. Our results provide evidence for the contribution of *DRD3* ($P=0.041$; odds ratio (OR)=4.00), *DBH* ($P=0.032$; OR=2.85), *TH* ($P=5.5e-03$; OR=4.34) and prenatal smoking ($P=1.7e-03$; OR=5.10) to the clinical efficacy of MPH, with a higher risk for treatment failure in genetically susceptible subjects whose mother smoked during pregnancy. Adverse events after MPH treatment were significantly associated with variation in *DBH* ($P=6.4e-03$; OR=0.28) and *DRD2* ($P=0.047$; OR=3.76). This study suggests that the dopaminergic system together with prenatal smoking exposure may moderate MPH treatment effects.

The Pharmacogenomics Journal (2017) 17, 98–104; doi:10.1038/tpj.2015.89; published online 26 January 2016

INTRODUCTION

Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is a childhood-onset neuropsychiatric disorder that affects around 5% of children and adolescents worldwide¹ and causes high costs to the health-care system and society.²

Among the variety of pharmacological options available in ADHD treatment, methylphenidate (MPH) has shown to be generally effective in reducing ADHD symptoms and improving quality of life.³ However, a considerable interindividual variability exists in clinical outcome, optimal dosage and duration of effect,^{4,5} which may reflect underlying genetic influences.

Most of the pharmacogenetic studies conducted so far in ADHD patients have addressed MPH response, although genetic moderators of tolerability may be clinically more relevant than predictors of efficacy.⁶ These investigations have mainly focused on genes related to the catecholamine neurotransmission, as MPH is thought to exert its therapeutic effects by increasing synaptic levels of dopamine through the inhibition of the dopamine transporter (DAT).⁷ Thus the *DAT1* gene has long been considered a prime candidate that may contribute to the effectiveness and safety of MPH. Numerous studies have investigated the 40-bp variable number of tandem repeats (VNTR) polymorphism in the 3'-untranslated region of *DAT1* as a possible source of variation in clinical response to MPH, given its putative role in regulating mRNA stability, nuclear transport and protein synthesis.⁸ However, the results published to date are controversial,^{9–15} and a recent meta-analysis based on 16 studies reported no significant summary effect sizes.¹⁶

The involvement of the dopamine receptor D4 (*DRD4*) in treatment outcome has also been extensively examined, as it regulates dopamine synthesis, release and neuron-firing rate.¹⁷ One of the most frequently studied polymorphisms is the 48-bp VNTR in exon 3 of *DRD4*. The seven-repeat allele, although consistently associated with ADHD,¹⁸ has yielded disparate results in pharmacogenetic studies.^{9,11,19,20} A second polymorphism in *DRD4*, consisting in a duplication of 120 bp in the promoter region, has been associated with improved response to MPH.¹²

Other investigations have evaluated the catechol-*O*-methyltransferase (COMT), which has a specific role in the catabolism of dopamine in the prefrontal cortex. The p.Val158Met polymorphism reduces the enzyme activity threefold²¹ and may moderate MPH effects on ADHD symptoms.^{11,12,22}

Few data are available regarding the impact of genetic variation in additional dopamine receptors or enzymes involved in the dopamine synthesis and degradation. Winsberg and Comings²³ attempted to relate the *DRD2* gene to the behavioral outcome of MPH therapy in 30 African-American ADHD children but no evidence of significant main effects was found while Tahir *et al.*²⁰ reported an association between a 151-bp allele of a microsatellite marker located 5' from the *DRD5* gene and favorable response to MPH. Only Contini *et al.*²⁴ have examined the role of *DBH* as a moderator of treatment outcome among adult patients, although the findings were negative.

The majority of studies, however, have focused on a single or few polymorphisms that may not be functional, may be too distant from the true causal variant or may exert an effect too small to reliably detect an association with small sample sizes,²⁵

¹Psychiatric Genetics Unit, Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ²Department of Psychiatry, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; ³Biomedical Network Research Centre on Mental Health (CIBERSAM), Barcelona, Spain; ⁴Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; ⁵Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain; ⁶Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Spain and ⁷Department of Psychiatry and Legal Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. Correspondence: Dr M Ribasés, Psychiatric Genetics Unit, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Passeig Vall d'Hebron 119-129, Barcelona 08035, Spain. E-mail: marta.ribases@vhir.org

Received 27 April 2015; revised 15 September 2015; accepted 2 November 2015; published online 26 January 2016

which could partially explain the absence of clear conclusions regarding MPH response. Distinct environmental influences that act to moderate the effects of genetic factors may also be responsible for discrepancies in the results.

Based on previous reports pointing to the involvement of genetic variants in the effectiveness and safety of MPH, we performed a pharmacogenetic study to evaluate the association of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) across nine dopamine-related genes with therapeutic response and risk of side effects in a sample of ADHD pediatric subjects receiving MPH treatment. To our knowledge, this is the first study that (1) assesses multiple SNPs covering, in terms of linkage disequilibrium, the genes encoding the main components of the dopamine neurotransmitter system; (2) considers gene–gene interactions and (3) examines whether environmental risk factors interplay with dopaminergic candidate genes in predicting the response and adverse events to MPH.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

The study sample included 107 ADHD pediatric patients for whom MPH was prescribed. Subjects were required to satisfy full Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM)-IV criteria for ADHD, be < 18 years of age, Spanish or Caucasian origin and have never been exposed to MPH. Patients with an Intelligent Quotient < 70 or having pervasive developmental disorders were not eligible for the investigation. Additional exclusion criteria included schizophrenia or other psychotic disorders; adoption; sexual or physical abuse; birth weight < 1.5 kg; any significant neurological or systemic disease that might explain ADHD symptoms; and clinical contra-indication to MPH. Comorbid oppositional defiant disorder, conduct disorder, depression and anxiety disorders were allowed unless determined to be the primary cause of ADHD symptomatology. The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Universitari Vall d'Hebron. Written informed consent was obtained from parents/caregivers.

Clinical assessment

Diagnosis of ADHD and comorbidities were established by child psychiatrists blind to patients' genotypes through the Present and Lifetime version of the Kiddie Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children. Furthermore, families were interviewed with the Clinical Global Impression-Severity scale (CGI-S). Additional information on clinical assessment is available in Supplementary Material.

Pharmacological intervention

Patients were treated according to the program's recommendations of initiating treatment with MPH at low-to-moderate dose and titrating to higher doses until no further clinical improvement or limiting adverse effects were observed. The mean daily dose of MPH prescribed was 1.07 mg kg⁻¹ (s.d. = 0.30). Risperidone was the most frequent concomitant drug.

Treatment outcome

We considered the Improvement subscale of the Clinical Global Impression scale (CGI-I) as the primary outcome measure of treatment success. The CGI-S scale, applied at baseline and after 8 weeks of treatment, was used as a secondary outcome measure by both categorical and dimensional approaches for those risk variants associated with MPH response according to the CGI-I scale. Stimulants' side effects were elicited through systematic questions at each visit during the first 2 months of treatment. Patients and their parents were asked about the presence or absence of the 17 symptoms listed on the Side Effects Rating Scale developed by Barkley.²⁶ Any reported side effect was counted as positive, independently of its frequency or severity. Criteria used for therapeutic response evaluation can be found in Supplementary Material.

Environmental screening

Fourteen prenatal and perinatal risk factors were assessed during an interview with the mother in 86 study members (Supplementary Material).

Experimental procedures

The DNA isolation procedure is described elsewhere.²⁷ We examined nine candidate genes involved in dopaminergic neurotransmission that encode five dopamine receptors (*DRD1-5*), the dopamine transporter (*DAT1*) and three enzymes responsible for dopamine synthesis (*TH*) and degradation (*COMT* and *DBH*). The SNP selection strategy used was published previously.²⁸ All SNPs were genotyped using the SNPlex Genotyping Platform (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Of the 69 SNPs initially chosen, 12 were discarded from the analysis (Supplementary Material).

Statistical analyses

The minimal statistical power was estimated using the Genetic Power Calculator software (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc>). Assuming a significance level of 0.05, the lowest minor allele frequency observed in our study (0.15), and a prevalence of 0.30 and 0.39, we were able to detect odds ratio values > 2.5 for treatment failure and adverse events with moderate-to-high statistical power (76% and 89.9%, respectively) in a codominant model of inheritance.^{29,30}

The presence of population stratification was previously discarded.³¹ Potential confounders were included as covariates based on a statistical definition (association with both the study factor and outcome for $P \leq 0.20$).³²

Genotype frequencies were tested for Hardy–Weinberg equilibrium ($P < 0.01$) using a Chi-square test. The effects of genetic polymorphisms on MPH response or adverse events were examined with the SNPAssoc R package (<http://www.cran.r-project.org/web/packages/SNPAssoc>). Those SNPs displaying nominal associations when analyzing genotypes under a codominant model or alleles were also studied under dominant and recessive models. The Bonferroni correction for multiple comparisons, considering 57 SNPs, the analysis of genotype and allele frequencies and two different outcomes (MPH response and adverse effects), establishes the significance threshold at $P \leq 2.2e-04$.

The haplotype-based association study was restricted to genes nominally associated with treatment outcome or adverse events in the single-marker analysis. The best two-marker haplotype from all possible combinations was identified for each of these genes. Additional markers (up to four) were added in a stepwise manner to the initial two-SNP haplotype and specific estimated haplotypes were subsequently assigned to individuals with the PHASE 2.0 software (<http://stephenslab.uchicago.edu/software.html#phase>). Significance was estimated using 10 000 permutations with the UNPHASED software (<https://sites.google.com/site/fduddbridge/software>). The best two-, three- or four-marker haplotypes identified were subsequently tested for association with the primary outcome measure of treatment success or adverse events using the statistical package SPSS 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

The gene-by-environment (G × E) analysis was restricted to sequence variants identified in the pharmacogenetic study and environmental risk factors associated with either clinical outcome or adverse events after Bonferroni correction (significance threshold at $P \leq 3.6e-03$, considering the 14 prenatal and perinatal risk factors assessed).

Pearson's Chi-square test, Fisher's exact test, Student's *t*-test or non-parametric Mann–Whitney *U*-test were applied, where appropriate. For additional data on statistical analyses, see Supplementary Material.

RESULTS

Subjects were predominantly male (88.8%), with an average age at assessment of 9.36 (s.d. = 2.76) years (range 5–16). Seventy-four percent of participants ($n = 79$) met DSM-IV criteria for ADHD-combined subtype, 20.6% ($n = 22$) had ADHD-inattentive subtype and 5.61% ($n = 6$) were diagnosed with ADHD-hyperactive-impulsive subtype. Comorbid disorders were present in a small number of patients (20.6%), the main ones being disabilities in reading and writing (9.35%), oppositional defiant disorder (6.54%) and anxiety disorders (1.87%).

Seventy-nine percent of subjects ($n = 84$) responded favorably to treatment according to the CGI-I scale, while 21.5% ($n = 23$) failed to show a clinical response to MPH. Responders and non-responders were comparable with regard to age, sex, ADHD subtype, comorbidity, use of concomitant medication, MPH dose and drug formulation ($P > 0.05$). There were significant differences, however, in the severity of symptoms as assessed by the CGI-S

Table 1. (a) Haplotype-based association study between 10 *DRD3* SNPs and methylphenidate response and (b) haplotype distributions of rs2134655 and rs1800828

(a)			
Methylphenidate response ^b			
Haplotype ^a	Global P-value	Best haplotype-specific P-value (adjusted P-value)	OR (95% CI)
2-9	0.031	0.012 (0.028)	2.40 (1.20–4.80)
2-3-9	0.062	9.5e-03 (0.043)	2.47 (1.23–4.95)
(b)			
Methylphenidate response ^b			
Haplotype ^a	Non-responders	Responders	Haplotype-specific P-value; OR (95% CI)
2-9			
A-G	7 (15.9)	53 (31.6)	0.040; 0.41 (0.17–0.98) ^c
G-C	8 (18.2)	40 (23.8)	—
G-G	29 (65.9)	75 (44.6)	0.012; 2.40 (1.20–4.80)
$\chi^2 = 6.94$; $df = 2$; $P = 0.031$			

Abbreviations: CI, confidence interval; *DRD3*, dopamine receptor D3; OR, odds ratio; SNP, single-nucleotide polymorphism. ^a2-rs2134655; 3-rs9880168; 9-rs1800828. Best multiple-marker combination in bold. ^bDefined by a Clinical Global Impression-Improvement score ≤ 2 . ^cUnder-represented in non-responders.

scale ($P = 0.043$), with children resistant to MPH scoring higher at the baseline evaluation than children showing clinical improvement.

Regarding MPH tolerability, 65.1% of patients ($n = 69$) presented some treatment-related side effect, with insomnia (34.3%) and appetite reduction (25%) being the most prevalent ones. When subjects were divided according to the emergence of adverse events, no significant differences were found in any of the variables mentioned above, except for MPH dose ($P = 0.050$) and the rate of comorbid conditions ($P = 0.030$). MPH dose was significantly higher, whereas comorbid disorders were less frequent in children exhibiting side effects.

MPH response according to the CGI-I scale

The single-marker analysis identified three SNPs in *DRD3*, *DBH* and *TH* displaying a nominal association with the primary outcome measure: rs2134655 ($P = 0.022$; odds ratio (OR) = 3.03 (1.14–8.33)), rs2073833 ($P = 0.030$; OR = 6.25 (0.78–50)) and rs2070762 ($P = 0.020$; OR = 3.03 (1.19–7.69)), respectively (Supplementary Table S1). We included CGI-S baseline scores as a covariate in the analysis of rs2070762, as they were associated with both MPH response ($P = 0.043$) and rs2070762 ($P = 0.033$), and found that subjects homozygous for the rs2070762C allele, who started from lower CGI-S scores than carriers of the rs2070762T variant, had a poorer treatment response ($P = 5.5e-03$; OR = 4.34 (1.54–12.2)).

Consistent with the single-marker study, the multiple-marker analysis highlighted an association between clinical outcome and a two-marker haplotype in *DRD3* (rs2134655-rs1800828; global P -value = 0.031; Table 1a) with an overrepresentation of the rs2134655G-rs1800828G allelic combination in the non-responders group ($P_{\text{adjusted}} = 0.028$; OR = 2.40 (1.20–4.80); Table 1b). We then considered the frequency of the rs2134655G-rs1800828G carriers and confirmed the association between *DRD3* and treatment failure ($P = 0.041$; OR = 4.00 (0.87–18.4)). The haplotype-based analysis of *DBH* also revealed a two-marker haplotype associated with MPH response (rs1541332-rs2073833; global P -value = 0.042; Table 2a) with an overrepresentation of the rs1541332T-rs2073833C allelic combination among treatment-resistant patients ($P_{\text{adjusted}} = 0.049$;

OR = 3.43 (1.59–7.40); Table 2b). An increased frequency of this risk haplotype carriers was observed in the non-responders group ($P = 0.032$; OR = 2.85 (1.07–7.62)).

The combined effect of the *TH* rs2070762C/C genotype and the risk haplotypes at *DRD3* (rs2134655G-rs1800828G) and *DBH* (rs1541332T-rs2073833C) accounted for 18.4% of the variability in MPH response. Additionally, we explored possible interactions between the markers identified and found no evidence supporting the existence of epistatic effects in the risk to develop treatment resistance.

MPH response according to the CGI-S scale

In order to demonstrate the robustness of our findings, we expanded our analysis to examine the effect of genetic variants in *DRD3*, *DBH* and *TH* associated with the primary outcome measure on MPH response using the CGI-S scale. In agreement with the results observed in CGI-I scores, subjects homozygous for the rs2070762C allele in the *TH* gene or carriers of the rs1541332T-rs2073833C allelic combination in *DBH* showed an increased risk for treatment failure when we considered an improvement of at least two points on the CGI-S scale at follow-up ($P = 0.017$; OR = 4.33 (1.21–15.5) and $P = 0.011$; OR = 4.58 (1.32–15.9), respectively). Additionally, a significant impact of rs2070762 on the variation in CGI-S scores was identified, as patients homozygous for the rs2070762C allele exhibited a smaller symptom reduction than carriers of the T allele ($P = 7.1e-03$; CC genotype: mean score = 1.92 (s.d. = 0.82); CT/TT genotypes: mean score = 2.36 (s.d. = 0.69).

Adverse events after MPH treatment

Nominally significant differences were found for rs2007153 ($P = 0.016$; OR = 2.07 (1.15–3.73)) and rs2797855 ($P = 0.048$, under a codominant model) in *DBH* and rs2283265 ($P = 0.013$; OR = 4.31 (1.18–15.7)) within *DRD2* (Supplementary Table S1). Patients carrying the rs2283265T allele received a significantly higher MPH dose than subjects homozygous for the rs2283265G variant ($P = 0.061$) and had an increased risk for adverse

Table 2. (a) Haplotype-based association study between 12 *DBH* SNPs and methylphenidate response and (b) haplotype distributions of rs1541332 and rs2073833

(a)			
<i>Methylphenidate response^b</i>			
<i>Haplotype^a</i>	<i>Global P-value</i>	<i>Best haplotype-specific P-value (adjusted P-value)</i>	<i>OR (95% CI)</i>
5-10	0.042	9.7e-03 (0.049)	3.43 (1.59-7.40)
2-5-10	0.018	0.014 (0.085)	3.23 (1.47-7.06)
(b)			
<i>Methylphenidate response^b</i>			
<i>Haplotype^a</i>	<i>Non-responders</i>	<i>Responders</i>	<i>Haplotype-specific P-value; OR (95% CI)</i>
5-10			
C-C	12 (27.3)	73 (43.5)	—
C-G	9 (20.5)	22 (13.1)	—
T-C	15 (34.1)	22 (13.1)	9.7e-03; 3.43 (1.59-7.40)
T-G	8 (18.2)	51 (30.4)	—
$\chi^2 = 8.19$; $df = 3$; $P = 0.042$			

Abbreviations: CI, confidence interval; *DBH*, dopamine beta-hydroxylase; OR, odds ratio; SNP, single-nucleotide polymorphism. ^a2-rs2797851; 5-rs1541332; 10-rs2073833. Best multiple-marker combination in bold. ^bDefined by a Clinical Global Impression-Improvement score ≤ 2 .

Table 3. (a) Haplotype-based association study between 12 *DBH* SNPs and adverse effects and (b) haplotype distributions of rs2007153, rs2797853 and rs77905

(a)			
<i>Adverse effects</i>			
<i>Haplotype^a</i>	<i>Global P-value</i>	<i>Best haplotype-specific P-value (adjusted P-value)</i>	<i>OR (95% CI)</i>
1-7	0.010	1.5e-03 (5.1e-03)	0.33 (0.18-0.63)
1-7-9	0.028	1.4e-03 (0.027)	0.29 (0.14-0.61)
(b)			
<i>Adverse effects</i>			
<i>Haplotype^a</i>	<i>Presence</i>	<i>Absence</i>	<i>Haplotype-specific P-value; OR (95% CI)</i>
1-7-9			
A-G-C	14 (12.3)	23 (32.9)	1.4e-03; 0.29 (0.14-0.61) ^b
A-G-T	11 (9.6)	7 (10)	—
G-A-C	7 (6.1)	4 (5.7)	—
G-A-T	32 (28.1)	19 (27.1)	—
G-G-C	32 (28.1)	11 (15.7)	—
G-G-T	18 (15.8)	6 (8.6)	—
$\chi^2 = 12.5$; $df = 5$; $P = 0.028$			

Abbreviations: CI, confidence interval; *DBH*, dopamine beta-hydroxylase; OR, odds ratio; SNP, single-nucleotide polymorphism. ^a1-rs2007153; 7-rs2797853; 9-rs77905. Best multiple-marker combination in bold. ^bUnder-represented in patients displaying adverse effects.

effects, considering MPH dose as a covariate ($P = 0.047$; $OR = 3.76$ (1.02-13.9)).

The multiple-marker analysis revealed a three-marker haplotype in *DBH* associated with the emergence of side effects (rs2007153-rs2797853-rs77905; global P -value = 0.028; Table 3a). The rs2007153A-rs2797853G-rs77905C haplotype was significantly more frequent in patients tolerating the medication ($P_{\text{adjusted}} = 0.027$; $OR = 0.29$ (0.14-0.61); Table 3b). In particular, carriers of this allelic combination were 61.9% less likely to present adverse events ($P = 0.020$). As comorbidity was

associated with both adverse events ($P = 0.030$) and the *DBH* haplotype ($P = 0.154$), we adjusted the analysis for comorbid conditions and corroborated the protective effect of the rs2007153A-rs2797853G-rs77905C combination ($P = 6.4e-03$; $OR = 0.28$ (0.11-0.70)).

The additive effect of the *DBH* rs2007153A-rs2797853G-rs77905C haplotype and the rs2283265T allele in *DRD2* explained 15.7% of the phenotypic variance in MPH tolerability. Epistasis analysis, however, showed no evidence of gene-gene interactions between them.

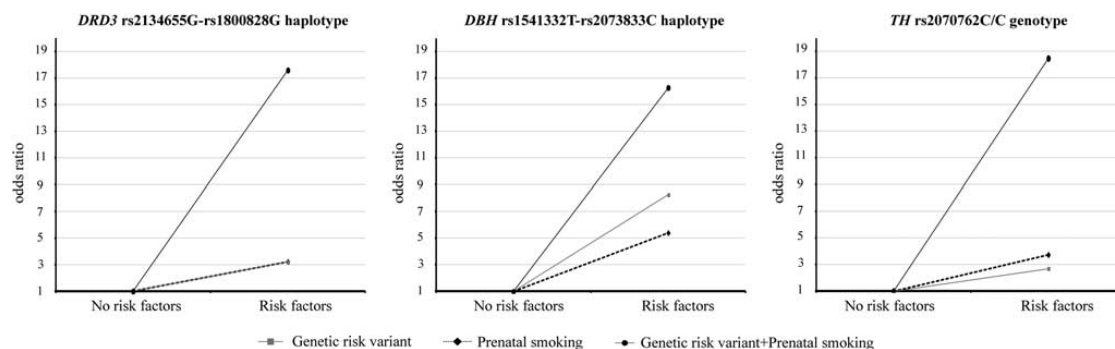


Figure 1. Gene-by-environment analysis between *DRD3*, *DBH*, *TH* and prenatal smoking on methylphenidate response according to the Clinical Global Impression-Improvement scale.

Gene-by-environment interactions

We subsequently examined the effect of 14 prenatal and perinatal risk factors on clinical outcome or adverse events and found association between prenatal smoking and MPH response according to the CGI-I scale ($P=1.7e-03$). More than 31% of mothers ($n=27$) reported smoking cigarettes during pregnancy, and their offspring had a poorer treatment response than those who were not prenatally exposed to nicotine (OR = 5.10 (1.76–14.8)).

Stratified analysis, based on maternal smoking and the presence of the risk variants identified in the pharmacogenetic study, disentangled significant interactions between prenatal smoking and *DRD3*, *DBH* or *TH* on MPH response. The risk for treatment failure was higher for carriers of the risk variants in *DRD3* (rs2134655G–rs1800828G haplotype; $P=2.2e-03$; OR = 17.6 (1.96–157.9)), *DBH* (rs1541332T–rs2073833C haplotype; $P=2.9e-04$; OR = 16.3 (2.79–94.7)) or *TH* (rs2070762C/C genotype; $P_{adjusted}=7.5e-04$; OR = 18.5 (3.40–101.1)) whose mother smoked during pregnancy (Figure 1). The joint effect of *in utero* exposure to tobacco and the *DBH* rs1541332T–rs2073833C haplotype or the *TH* rs2070762C/C genotype on MPH response was also identified when assessed using the CGI-S scale according to the categorical approach. Additionally, the rs2070762 significantly interplayed with prenatal smoking on the variation in CGI-S scores (data not shown).

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study that examines multiple SNPs across genes encoding the main components of the dopaminergic system to identify genetic factors that moderate response variability in ADHD treatment. Specifically, we aimed to (1) identify genetic factors as potential predictors of MPH response; (2) identify genes involved in MPH tolerability; and (3) examine $G \times E$ interactions that may influence treatment effects. Our results provide preliminary evidence for the contribution of *DRD3*, *DBH*, *TH* and prenatal smoking to the clinical efficacy of MPH, with a higher risk for treatment failure in genetically susceptible subjects whose mother smoked during pregnancy. Additionally, we identified a significant association between variation in *DBH* and *DRD2* and adverse events after MPH treatment.

The role of *DBH* as a moderator of treatment outcome is supported by the association found with both MPH tolerability and response according to two different scales but contradicts a prior pharmacogenetic study.²⁴ Although the discrepancy may be attributed to differences in subjects' characteristics, therapeutic response evaluation or the polymorphisms assessed, we cannot exclude spurious positive signals, given our limited sample size. We also provide evidence for the involvement of *DRD3* in MPH

response, which is in agreement with McCracken *et al.*,³³ who reported a relationship between *DRD3* and clinical improvement of hyperactive-impulsive behaviors in children with autism spectrum disorders (ASD). This previous investigation examined six SNPs within *DRD3*, including the rs2134655 variation highlighted in the present study, but no overlap between positive signals was identified across studies. As McCracken *et al.*³³ considered a sample of ASD subjects, these differences may be due to underlying disorder neurobiology. Another interesting finding arising from our research is the impact of rs2070762 in *TH* on both the responder status and symptom scores after MPH treatment. Although the current report is the first that examines the contribution of *TH* to the variability in treatment outcome, this polymorphism has previously been associated with ADHD²⁸ and evidence from *in vitro* assays suggests a potential regulatory activity for this intronic variant.³⁴ Interestingly, the enzymes encoded by *TH* and *DBH* are involved in the dopamine synthesis and dopamine conversion to norepinephrine, respectively, which suggests that functional variants within these genes may moderate dopamine availability at the synaptic cleft and therefore clinical outcome.

For the most part, pharmacogenetic research has focused on genes presumably related to the mechanism of action of MPH, namely *DAT1*, *DRD4* or *COMT*. The sequence variants assessed in the current investigation were selected to ensure full genetic coverage of candidate genes, not according to their potential functional implications. Thus we did not genotype individuals for previously studied markers such as the 40-bp VNTR in *DAT1* or the 48-bp VNTR in *DRD4*. However, none of the SNPs located in these genes displayed significant associations with either MPH response or side effects. This is in agreement with a prior meta-analysis and several individual studies reporting that the classic candidate genes in ADHD pharmacogenetics do not have an important role in treatment response or adverse events.^{11,16,35} Conversely, we propose that variants in genes not extensively examined, but rational candidates given their distribution and regulatory functions in the dopamine neurotransmitter system, may influence the ability of MPH to exert its therapeutic effects.

Additionally, studies conducted so far in ADHD patients have emphasized the efficacy of MPH and have focused little on side effects. Our results suggest that variants in *DBH* and *DRD2* are associated with MPH tolerability. The putative impact of *DRD2* on adverse events is supported by previous findings from McCracken *et al.*,³³ who reported an association between *DRD2* and the rate of treatment discontinuation. Moreover, the rs2283265G allele, which increases mRNA expression of an alternative splicing variant of *DRD2*,³⁶ has recently been implicated in the emotion dysregulation experienced by children with ASD.³⁷ This is of particular interest, as increased emotionality and dysphoria occur

in a subgroup of MPH-treated patients with ADHD and there is evidence suggesting that they may be partially moderated by genetic influences.³⁸

Considering that evidence of a direct relation between genetic polymorphisms and ADHD treatment has been inconsistent, we hypothesized that clinical response to MPH may be the result of a much more complex matrix of factors, including both genetic and environmental risks. Although epidemiological studies have demonstrated that exposure to various stressors, especially during pregnancy and delivery, such as tobacco smoking, alcohol consumption, stressful life events, and obstetrical complications are associated with an increased risk for ADHD,³⁹ to date only Grizenko *et al.*⁴⁰ examined whether the severity of maternal stress affected the children's response to MPH. The authors did not find significant differences in the child's responder status, suggesting that it may not be related to early environmental factors. In contrast, we revealed a strong association between prenatal smoking and clinical outcome, where children whose mother reported smoking cigarettes during pregnancy showed a poorer treatment response than those who were not exposed. The subsequent G × E analysis unraveled significant epistatic effects between prenatal smoking and *DRD3*, *DBH* or *TH* on MPH response. Similarly, earlier investigations have demonstrated that polymorphisms in dopamine-related genes act in conjunction with maternal smoking to modify the risk and severity of ADHD,^{41,42} but no other study has explored G × E interactions between them with regard to MPH response. A prior report, however, assessed the joint effect of SNPs in the *LPHN3* gene and maternal smoking or stress during pregnancy in a double-blind, placebo-controlled, cross-over trial.⁴³ Choudhry *et al.*⁴³ provided evidence for a significant association between *LPHN3* and treatment response, which only became apparent in the group where mothers experienced mild or minimal stress. In contrast, a complete lack of interaction was noted with *in utero* exposure to tobacco.

The main strengths of our findings include (1) the recruitment of stimulant-naïve patients; (2) the exclusion of confounding population substructures; (3) the full coverage of the dopaminergic genes assessed in terms of linkage disequilibrium; (4) the assessment of both efficacy and side effects and the use of different outcome measures of treatment success; and (5) the evaluation of gene–gene and G × E interactions. Some methodological aspects, however, should also be considered when interpreting the results of the current study: (1) Our estimate of a 20.6% comorbidity rate is in contrast with the high prevalence reported in the literature, where approximately two-thirds of ADHD children have impairing comorbid diagnoses.^{44–46} The clinical sample was composed of Spanish ADHD children who had never been exposed to stimulant medication and with an average age at assessment of 9.36 years, which could explain the small number of patients with comorbidity. Although modest, this proportion may influence treatment outcome and thus the presence of comorbid disorders has been considered as a potential confounder. (2) The naturalistic design may have limited the power of our analyses. However, the rate of response to MPH was similar to that generally found in placebo-controlled clinical trials, and we minimized the probability that differences between carriers and non-carriers of the studied alleles might be attributed to other factors by performing a comprehensive assessment of potential confounders. (3) The lack of a strictly standardized medication titration, although patients were treated in a comparable manner by the same experienced psychiatrists. (4) MPH was administered with no control of adherence by clinicians. (5) Information on environmental risk factors was collected retrospectively and may therefore be subject to recall bias. (6) Other prenatal factors, such as maternal stress during pregnancy, or postnatal factors that we did not examine may influence the efficacy or tolerability of MPH treatment. (7) Variability in genes that are known to interact with the

dopaminergic system has not been considered. In this sense, *LPHN3* represents a very promising candidate, as it has shown to confer susceptibility to ADHD and moderate MPH response, either alone or in conjunction with environmental factors.^{43,47–52}

In conclusion, despite the relatively limited sample size, we identified *DRD3*, *DBH*, *TH*, *DRD2* and prenatal exposure to nicotine as potential predictors of MPH treatment effects. Further pharmacogenetic studies with larger samples are required to fully validate these results and to disentangle the impact of prenatal smoking on clinical response to MPH in genetically susceptible children.

CONFLICT OF INTEREST

Professor Casas has received travel grants and research support from Eli Lilly, Janssen-Cilag, Shire and Laboratorios Rubió. He has been on the advisory board and served as a consultant for Eli Lilly, Janssen-Cilag, Shire and Laboratorios Rubió. Dr Ramos-Quiroga has served on the speakers' bureau and acted as consultant for Eli Lilly, Janssen-Cilag, Novartis, Lundbeck, Shire, Ferrer and Laboratorios Rubió. He has received travel awards from Eli Lilly, Janssen-Cilag and Shire for participating in psychiatric meetings. The ADHD Program chaired by Dr Ramos-Quiroga has received unrestricted educational and research support from Eli Lilly, Janssen-Cilag, Shire, Rovi and Laboratorios Rubió in the past 2 years. The other authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

Mireia Pagerols and Iris Garcia-Martínez are recipients of a predoctoral fellowship from the Vall d'Hebron Research Institute (PRED-VHIR-2013 and PRED-VHIR-2012). Cristina Sánchez-Mora is a recipient of a contract from the 7th Framework Programme for Research, Technological Development and Demonstration, European Commission (AGGRESSOTYPE_FP7HEALTH2013/602805). Marta Ribasés is a recipient of a Miguel de Servet contract from the Instituto de Salud Carlos III, Spain (CP09/00119). This work was funded by Fundación Alicia Koplowitz and Instituto de Salud Carlos III (PI11/00571, PI11/01629, PI12/01139, PI14/01700) and cofinanced by the European Regional Development Fund (ERDF), Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca-AGAUR, Generalitat de Catalunya (2014SGR1357, 2014SGR0932), Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO, SAF2012-33484), Spain, the European College of Neuropsychopharmacology (ECNP network: 'ADHD across the lifespan') and Departament de Salut, Government of Catalonia, Spain.

REFERENCES

- 1 Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, Biederman J, Rohde LA. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry* 2007; **164**: 942–948.
- 2 Pelham WE, Foster EM, Robb JA. The economic impact of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents. *J Psychiatr Psychol* 2007; **32**: 711–727.
- 3 Greenhill L, Beyer DH, Finkleson J, Shaffer D, Biederman J, Conners CK *et al.* Guidelines and algorithms for the use of methylphenidate in children with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *J Atten Disord* 2002; **6** (Suppl 1): S89–S100.
- 4 Charach A, Ickowicz A, Schachar R. Stimulant treatment over five years: adherence, effectiveness, and adverse effects. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2004; **43**: 559–567.
- 5 Wolraich ML, Doffing MA. Pharmacokinetic considerations in the treatment of attention-deficit hyperactivity disorder with methylphenidate. *CNS Drugs* 2004; **18**: 243–250.
- 6 Polanczyk G, Bigarella MP, Hutz MH, Rohde LA. Pharmacogenetic approach for a better drug treatment in children. *Curr Pharm Des* 2010; **16**: 2462–2473.
- 7 Wilens TE. Effects of methylphenidate on the catecholaminergic system in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychopharmacol* 2008; **28** (Suppl 2): S46–S53.
- 8 VanNess SH, Owens MJ, Kilts CD. The variable number of tandem repeats element in DAT1 regulates in vitro dopamine transporter density. *BMC Genet* 2005; **6**: 55.
- 9 Froehlich TE, Epstein JN, Nick TG, Melguizo Castro MS, Stein MA, Brinkman WB *et al.* Pharmacogenetic predictors of methylphenidate dose-response in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2011; **50**: 1129–1139.e1122.
- 10 Joobar R, Grizenko N, Sengupta S, Amor LB, Schmitz N, Schwartz G *et al.* Dopamine transporter 3'-UTR VNTR genotype and ADHD: a pharmacological-behavioural

- genetic study with methylphenidate. *Neuropsychopharmacology* 2007; **32**: 1370–1376.
- 11 Kereszturi E, Tarnok Z, Bogнар E, Lakatos K, Farkas L, Gadoros J et al. Catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism is associated with methylphenidate response in ADHD children. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008; **147B**: 1431–1435.
 - 12 McGough JJ, McCracken JT, Loo SK, Manganiello M, Leung MC, Tietjens JR et al. A candidate gene analysis of methylphenidate response in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2009; **48**: 1155–1164.
 - 13 Purper-Ouakil D, Wohl M, Orejarena S, Cortese S, Boni C, Asch M et al. Pharmacogenetics of methylphenidate response in attention deficit/hyperactivity disorder: association with the dopamine transporter gene (SLC6A3). *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008; **147B**: 1425–1430.
 - 14 Stein MA, Waldman ID, Sarampote CS, Seymour KE, Robb AS, Conlon C et al. Dopamine transporter genotype and methylphenidate dose response in children with ADHD. *Neuropsychopharmacology* 2005; **30**: 1374–1382.
 - 15 Tharoor H, Lobos EA, Todd RD, Reiersen AM. Association of dopamine, serotonin, and nicotinic gene polymorphisms with methylphenidate response in ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008; **147B**: 527–530.
 - 16 Kambeitz J, Romanos M, Ettinger U. Meta-analysis of the association between dopamine transporter genotype and response to methylphenidate treatment in ADHD. *Pharmacogenomics* 2014; **14**: 77–84.
 - 17 Heckers S, Konradi C. Synaptic function and biochemical neuroanatomy. In: Martin A, Schill L, Charney DS, Leckman JF (eds). *Pediatric Psychopharmacology: Principles and Practice*. Oxford University Press: New York, USA, 2003, pp 20–32.
 - 18 Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE, Smoller JW, Goralnick JJ, Holmgren MA et al. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 2005; **57**: 1313–1323.
 - 19 Cheon KA, Kim BN, Cho SC. Association of 4-repeat allele of the dopamine D4 receptor gene exon III polymorphism and response to methylphenidate treatment in Korean ADHD children. *Neuropsychopharmacology* 2007; **32**: 1377–1383.
 - 20 Tahir E, Yazgan Y, Cirakoglu B, Ozbay F, Waldman I, Asherson PJ. Association and linkage of DRD4 and DRD5 with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in a sample of Turkish children. *Mol Psychiatry* 2000; **5**: 396–404.
 - 21 Lachman HM, Papolos DF, Saito T, Yu YM, Szumlanski CL, Weinshilboum RM. Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics* 1996; **6**: 243–250.
 - 22 Cheon KA, Jun JY, Cho DY. Association of the catechol-O-methyltransferase polymorphism with methylphenidate response in a classroom setting in children with attention-deficit hyperactivity disorder. *Int Clin Psychopharmacol* 2008; **23**: 291–298.
 - 23 Winsberg BG, Comings DE. Association of the dopamine transporter gene (DAT1) with poor methylphenidate response. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1999; **38**: 1474–1477.
 - 24 Contini V, Victor MM, Bertuzzi GP, Salgado CA, Picon FA, Grevet EH et al. No significant association between genetic variants in 7 candidate genes and response to methylphenidate treatment in adult patients with ADHD. *J Clin Psychopharmacol* 2012; **32**: 820–823.
 - 25 Mick E, Neale B, Middleton FA, McGough JJ, Faraone SV. Genome-wide association study of response to methylphenidate in 187 children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008; **147B**: 1412–1418.
 - 26 Barkley RA, McMurray MB, Edelbrock CS, Robbins K. Side effects of methylphenidate in children with attention deficit hyperactivity disorder: a systemic, placebo-controlled evaluation. *Pediatrics* 1990; **86**: 184–192.
 - 27 Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; **16**: 1215.
 - 28 Ribasés M, Ramos-Quiroga JA, Hervás A, Sánchez-Mora C, Bosch R, Bielsa A et al. Candidate system analysis in ADHD: evaluation of nine genes involved in dopaminergic neurotransmission identifies association with DRD1. *World J Biol Psychiatry* 2012; **13**: 281–292.
 - 29 Didoni A, Sequi M, Panei P, Bonati M. One-year prospective follow-up of pharmacological treatment in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Eur J Clin Pharmacol* 2011; **67**: 1061–1067.
 - 30 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**: 409–432.
 - 31 Ribasés M, Ramos-Quiroga JA, Hervás A, Bosch R, Bielsa A, Gastaminza X et al. Exploration of 19 serotonergic candidate genes in adults and children with attention-deficit/hyperactivity disorder identifies association for 5HT2A, DDC and MAOB. *Mol Psychiatry* 2009; **14**: 71–85.
 - 32 Maldonado G, Greenland S. Simulation study of confounder-selection strategies. *Am J Epidemiol* 1993; **138**: 923–936.
 - 33 McCracken JT, Badashova KK, Posey DJ, Aman MG, Schill L, Tierney E et al. Positive effects of methylphenidate on hyperactivity are moderated by monoaminergic gene variants in children with autism spectrum disorders. *Pharmacogenomics* 2014; **14**: 295–302.
 - 34 Wang L, Li B, Lu X, Zhao Q, Li Y, Ge D et al. A functional intronic variant in the tyrosine hydroxylase (TH) gene confers risk of essential hypertension in the Northern Chinese Han population. *Clin Sci (Lond)* 2008; **115**: 151–158.
 - 35 Zeni CP, Guimaraes AP, Polanczyk GV, Genro JP, Roman T, Hutz MH et al. No significant association between response to methylphenidate and genes of the dopaminergic and serotonergic systems in a sample of Brazilian children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2007; **144B**: 391–394.
 - 36 Zhang Y, Bertolino A, Fazio L, Blasi G, Rampino A, Romano R et al. Polymorphisms in human dopamine D2 receptor gene affect gene expression, splicing, and neuronal activity during working memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 20552–20557.
 - 37 Gadow KD, Pinsonneault JK, Perlman G, Sadee W. Association of dopamine gene variants, emotion dysregulation and ADHD in autism spectrum disorder. *Res Dev Disabil* 2014; **35**: 1658–1665.
 - 38 Gruber R, Joobar R, Grizenko N, Leventhal BL, Cook EH Jr., Stein MA. Dopamine transporter genotype and stimulant side effect factors in youth diagnosed with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 2009; **19**: 233–239.
 - 39 Ben Amor L, Grizenko N, Schwartz G, Lageix P, Baron C, Ter-Stepanian M et al. Perinatal complications in children with attention-deficit hyperactivity disorder and their unaffected siblings. *J Psychiatry Neurosci* 2005; **30**: 120–126.
 - 40 Grizenko N, Shayan YR, Polotskaia A, Ter-Stepanian M, Joobar R. Relation of maternal stress during pregnancy to symptom severity and response to treatment in children with ADHD. *J Psychiatry Neurosci* 2008; **33**: 10–16.
 - 41 Kahn RS, Khoury J, Nichols WC, Lanphear BP. Role of dopamine transporter genotype and maternal prenatal smoking in childhood hyperactive-impulsive, inattentive, and oppositional behaviors. *J Pediatr* 2003; **143**: 104–110.
 - 42 Neuman RJ, Lobos E, Reich W, Henderson CA, Sun LW, Todd RD. Prenatal smoking exposure and dopaminergic genotypes interact to cause a severe ADHD subtype. *Biol Psychiatry* 2007; **61**: 1320–1328.
 - 43 Choudhry Z, Sengupta SM, Grizenko N, Fortier ME, Thakur GA, Bellingham J et al. LPHN3 and attention-deficit/hyperactivity disorder: interaction with maternal stress during pregnancy. *J Child Psychol Psychiatry* 2012; **53**: 892–902.
 - 44 Elia J, Ambrosini P, Berrettini W. ADHD characteristics: I. Concurrent co-morbidity patterns in children & adolescents. *Child Adolesc Psychiatry Ment Health* 2008; **2**: 15.
 - 45 Klassen AF, Miller A, Fine S. Health-related quality of life in children and adolescents who have a diagnosis of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pediatrics* 2004; **114**: e541–e547.
 - 46 Larson K, Russ SA, Kahn RS, Halfon N. Patterns of comorbidity, functioning, and service use for US children with ADHD, 2007. *Pediatrics* 2011; **127**: 462–470.
 - 47 Acosta MT, Velez JI, Bustamante ML, Balog JZ, Arcos-Burgos M, Muenke M. A two-locus genetic interaction between LPHN3 and 11q predicts ADHD severity and long-term outcome. *Transl Psychiatry* 2011; **1**: e17.
 - 48 Arcos-Burgos M, Jain M, Acosta MT, Shively S, Stanescu H, Wallis D et al. A common variant of the latrophilin 3 gene, LPHN3, confers susceptibility to ADHD and predicts effectiveness of stimulant medication. *Mol Psychiatry* 2010; **15**: 1053–1066.
 - 49 Bruxel EM, Salatino-Oliveira A, Akutagawa-Martins GC, Tovo-Rodrigues L, Genro JP, Zeni CP et al. LPHN3 and attention-deficit/hyperactivity disorder: a susceptibility and pharmacogenetic study. *Genes Brain Behav* 2015; **14**: 419–427.
 - 50 Labbe A, Liu A, Atherton J, Gizenko N, Fortier ME, Sengupta SM et al. Refining psychiatric phenotypes for response to treatment: contribution of LPHN3 in ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2012; **159B**: 776–785.
 - 51 Lange M, Norton W, Coolen M, Chaminade M, Merker S, Proft F et al. The ADHD-susceptibility gene lphn3.1 modulates dopaminergic neuron formation and locomotor activity during zebrafish development. *Mol Psychiatry* 2012; **17**: 946–954.
 - 52 van der Voet M, Harich B, Franke B, Schenck A. ADHD-associated dopamine transporter, latrophilin and neurofibromin share a dopamine-related locomotor signature in *Drosophila*. *Mol Psychiatry* 2015; doi:10.1038/mp.2015.55.

Supplementary Information accompanies the paper on the The Pharmacogenomics Journal website (<http://www.nature.com/tj>)

2.3. Estudi 3. Anàlisi genòmica integradora de la resposta al MPH en pacients infantils amb TDAH

2.3.1. Resum

El MPH constitueix el principal tractament farmacològic per al TDAH en nens i adolescents. No obstant això, existeix una considerable variabilitat interindividual en la resposta clínica. Per aquest motiu, es portà a terme un GWAS sobre l'eficàcia del MPH en una mostra de cent setanta-tres pacients pediàtrics amb el trastorn. Malgrat que cap variant assolí el llindar de significació genòmica ($P \leq 5e-08$), es detectà un enriquiment significatiu en candidats prèviament estudiats en relació al TDAH o a la resposta terapèutica entre el conjunt de gens que contenien SNP nominalment associats al tractament farmacològic ($P < 0,05$). A continuació, els SNP nominals es prioritzaren en base a evidències sobre l'anotació funcional i l'anàlisi de *cis*-eQTL en cervell humà, i s'identificaren trenta-tres SNP relacionats amb els nivells d'expressió de trenta-dos gens diferents (referits com a eSNP i eGens, respectivament). L'anàlisi d'enriquiment de vies biològiques revelà una sobrerepresentació de gens involucrats en el desenvolupament i funció del sistema nerviós entre els eGens. Altres categories relacionades amb malalties neurològiques i psiquiàtriques, com el dèficit d'aprenentatge, o amb la conducta, com el comportament hiperactiu, també es trobaren significativament enriquides. Finalment, l'associació entre la resposta clínica i els trenta-tres eSNP identificats es meta-analitzà al llarg de la mostra d'estudi i d'una cohort independent de cent vuitanta-nou pacients adults amb TDAH, fet que evidencià quinze senyals suggestius. Així doncs, els resultats obtinguts a través d'aquesta estratègia integradora contribueixen a ampliar el coneixement sobre els mecanismes moleculars implicats en els efectes del tractament amb MPH i suggereixen candidats prometedors per a estudis futurs.

2.3.2. Referència

Pagerols, M., Richarte, V., Sánchez-Mora, C., Rovira, P., Soler Artigas, M., Garcia-Martínez, I., ... Ribasés, M. (2018). Integrative genomic analysis of methylphenidate response in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Sci Rep*, 8 (1), 1881.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

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

Received: 31 May 2017
Accepted: 15 January 2018
Published online: 30 January 2018

Mireia Pagerols^{1,2}, Vanesa Richarte^{2,3,4}, Cristina Sánchez-Mora^{1,2,3}, Paula Rovira^{1,2}, María Soler Artigas^{1,3}, Iris García-Martínez^{1,2}, Eva Calvo-Sánchez^{1,2}, Montse Corrales^{2,4}, Bruna Santos da Silva⁵, Nina Roth Mota^{6,7}, Marcelo Moraes Victor⁷, Luis Augusto Rohde^{7,8}, Eugenio Horacio Grevet^{7,8}, Claiton Henrique Dotto Bau^{5,7}, Bru Cormand^{9,10,11,12}, Miguel Casas^{1,2,3,4}, Josep Antoni Ramos-Quiroga^{1,2,3,4} & Marta Ribasés^{1,2,3}

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

Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is a neurodevelopmental disorder characterised by persistent and age-inappropriate symptoms of inattention, hyperactivity and/or impulsivity¹, which significantly impacts on academic, social, emotional and psychological functioning. With a worldwide prevalence ranging from 5.3 to 7.1% in school-age children and adolescents², ADHD is one of the most common childhood

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

psychiatric conditions and causes high costs to the healthcare system and society^{3,4}. Although its aetiology is largely unknown, several family, twin and adoption studies reported heritability estimates around 76%⁵, suggesting a strong genetic component in the pathogenesis of the disorder.

Among the wide variety of pharmacological options available in ADHD treatment, methylphenidate (MPH) is the first-line choice in paediatric patients, given its proved general efficacy in reducing ADHD symptoms and improving neuropsychological performance on executive functions^{6,7}. However, a considerable interindividual variability exists in clinical outcome, optimal dosage and duration of effect^{8,9}, which may reflect underlying genetic influences.

Most of the pharmacogenetic studies conducted so far in ADHD patients have focused on genes related to the catecholamine neurotransmission, with *SLC6A3* and *DRD4* being the most extensively investigated, since MPH is thought to exert its therapeutic effects through the inhibition of the dopamine and the norepinephrine transporters¹⁰. Based on this putative mechanism of action, additional genes such as *DRD2*, *DRD5*, *COMT*, *SLC6A2*, *ADRA2A*, *TPH2*, *SLC6A4*, *HTR1B*, *HTR2A* and *MAOA*¹¹ have been considered plausible candidates that may influence medication response. Nevertheless, a recent review on ADHD pharmacogenetics in childhood reported no consistent effects for dopaminergic and serotonergic signaling, and suggested neurodevelopmental genes as new promising targets¹².

Given that candidate gene-based investigations have not reached many compelling results, genome-wide association studies (GWAS) may represent an alternative, hypothesis-free approach to unravel the molecular mechanisms implicated in MPH treatment. To date, only one prior GWAS evaluated the efficacy of a MPH transdermal system in 187 children with ADHD¹³. Although no genome-wide significant associations were found, the metabotropic glutamate receptor 7 (*GRM7*) and two SNPs within the *SLC6A2* gene showed potential involvement in MPH response. Using that sample, Mick *et al.*¹⁴ conducted a secondary GWAS of changes in blood pressure after MPH therapy and detected nominal evidence for genes functionally related to blood pressure regulation and other cardiovascular phenotypes, including a SNP in a K⁺-dependent Na⁺/Ca²⁺ exchanger (*SLC24A3*). Furthermore, despite the fact that GWAS have been useful to identify genetic risk loci for multiple complex conditions, yet the functional effects of the trait-associated variants and the underlying pathological mechanisms remain mainly elusive.

Based on the absence of clear conclusions regarding MPH response raised by previous genetic studies, we undertook a GWAS of MPH efficacy in 173 ADHD paediatric patients and, for the first time to our knowledge, we integrated data from functional annotation, expression quantitative trait loci (eQTL) and enrichment analyses to characterise the biological pathways associated with treatment response. Additionally, we performed a polygenic risk score analysis and a meta-analysis across the study sample and an independent population of 189 ADHD adult patients.

Materials and Methods

Discovery population. The study sample included 173 ADHD paediatric patients for whom MPH was prescribed. Subjects were required to satisfy full DSM-IV criteria for ADHD, be under 18 years of age, Spanish of Caucasian origin and have never received MPH treatment. Patients with an IQ below 70 or having pervasive developmental disorders were not eligible for the investigation. Additional exclusion criteria included schizophrenia or other psychotic disorders; adoption; sexual or physical abuse; birth weight <1.5 kg; any significant neurological or systemic disease that might explain ADHD symptoms; and clinical contra-indication to MPH. Comorbid oppositional defiant disorder, conduct disorder, depression and anxiety disorders were allowed unless determined to be the primary cause of ADHD symptomatology. The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Universitari Vall d'Hebron and all methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations. Written informed consent was obtained from parents/caregivers.

Clinical assessment. Diagnoses of ADHD and comorbidities were established by child psychiatrists blind to patients' genotypes through the Present and Lifetime version of the Kiddie Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children (K-SADS-PL). Furthermore, families were interviewed with the Clinical Global Impression-Severity scale (CGI-S). Additional information on clinical assessment is available elsewhere¹⁵.

Pharmacological intervention. Patients were treated according to the program's recommendations of initiating treatment with MPH at low to moderate dose and titrating to higher doses until no further clinical improvement or limiting adverse effects were observed. The mean daily dose of MPH prescribed was 1.06 mg/kg (SD = 0.28). Risperidone was the most frequent concomitant drug.

Treatment outcome. We considered the Clinical Global Impression-Improvement scale (CGI-I)¹⁶, which ranges from 1 ('very much improved') to 7 ('very much worse'), as the primary outcome measure of treatment success. Those patients rated with a CGI-I score of two points or less after eight weeks of treatment were considered as responders, while the remaining were classified as non-responders.

Genome-wide association study. Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes by a salting out procedure¹⁷. A total of 173 samples were genotyped on the Infinium PsychArray-24 BeadChip platform (Illumina, San Diego, CA, USA), which covers 588,628 markers, and processed at the Stanley Center for Psychiatric Research, Broad Institute of MIT and Harvard (Cambridge, MA, USA). Pre-imputation quality control and principal components analysis were implemented following the QC and PCA modules from the Ricopili with the default settings (<https://sites.google.com/a/broadinstitute.org/ricopili/>). Genotype imputation was performed with the pre-phasing and imputation strategy using the EUR population of the 1,000 Genomes Project Phase 1 dataset as the reference panel (<http://www.1000genomes.org/>). We assured the accuracy of the imputation

data by filtering best-guess genotypes for an info score < 0.3 . This resulted in a total of 11,051,824 markers eligible for association tests.

Before GWAS analysis, further quality control measures were applied using the PLINK software¹⁸. Individuals exhibiting high rates of genotype missingness ($> 98\%$) were removed, as well as SNPs with low call rate (< 0.99), $MAF < 0.01$ or failing Hardy-Weinberg equilibrium test ($P < 1e-06$).

Finally, 173 subjects and 3,566,199 variants were tested for association with MPH response through logistic regression under an additive model, which included those clinical variables (i.e., CGI-S baseline scores) and principal components (i.e., PC6) significantly associated with clinical outcome ($P \leq 0.05$) as covariates.

Identification of candidate causal SNPs. Among the SNPs showing nominal association with treatment outcome ($P < 0.05$), we used the genome pipeline of SNPinfo (<http://snpinfo.niehs.nih.gov/>)¹⁹ to prioritise those that were more likely to affect protein sequence, transcriptional regulation, mRNA splicing or miRNA binding based on functional annotation. GenomePipe parameter values included: GWAS population = CEU; study population = CEU; flanking region = 200,000 bp; GWAS P-value < 0.05 ; LD threshold = 0.8; and $MAF = 0.01$ for all prediction methods. Additionally, we combined both the predicted conserved transcription factor-binding sites (TFBS) with the regulatory potential score (RP Score; available at <http://genome.ucsc.edu>) to improve predictions as suggested in several studies^{20–22}.

Cis-expression quantitative trait loci analysis. Cis-eQTL analysis was conducted on 193 neuropathologically normal cortical samples of adult humans from Myers *et al.*²³. Expression-genotype pairs were extracted after extending the genotyped data by imputation as previously described, and considering a 10 kb window around the untranslated regions. Rank-invariant normalised expression levels were \log_{10} transformed and transcripts detected in less than 75% of the samples were discarded from the study. Association tests were performed under a linear model with the MatrixEQTL R Package²⁴, including gender, age at death, cortical region, day of expression hybridisation, institute source of sample, post-mortem interval and transcripts detected rate in each sample as covariates.

Functional and pathway enrichment analysis. The biological functions and pathways related to genes containing at least one SNP nominally associated with both MPH response and human cortical expression levels (referred to as eSNPs) were assessed through the Ingenuity Pathway Analysis software (IPA) (Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA; www.ingenuity.com). IPA was also used to test for over-representation of genes previously studied in either ADHD or treatment outcome. Candidate genes for ADHD or MPH response were selected based on the gene list provided by the ADHDgene database (<http://adhd.psych.ac.cn/index.do>)²⁵ and a comprehensive search for published reviews of ADHD genetic and pharmacogenetic studies^{11,12,26–31}. Thus, a total of 436 genes were considered (Supplementary Table S1). Fisher's exact tests, with a Benjamini-Hochberg-adjusted P-value (P_{B-H}) < 0.05 as significance threshold, were applied in all analyses. To achieve meaningful statistics and interpretation of the results, we restricted the enrichment analysis to those annotation terms that included ≥ 2 genes of our dataset.

Polygenic risk score analysis. We generated polygenic risk scores (PRS) based on the results of the present GWAS using the Polygenic Risk Score software (PRSice)³². A logistic regression model was applied to test whether PRS at multiple stepwise P-value thresholds (i.e., $P_T < 1e-04$, $P_T < 1e-03$, $P_T < 0.05$, $P_T < 0.1$, $P_T < 0.2$, $P_T < 0.3$, $P_T < 0.4$, and $P_T < 0.5$) predicted treatment outcome in an independent sample of patients with ADHD (target population). The target population comprised 189 Brazilian adults from the Adult ADHD Outpatient Clinic of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, who underwent immediate-release MPH treatment. Diagnoses of ADHD and comorbidities, as well as inclusion/exclusion criteria, were achieved as previously described³³. The outcome measures of MPH treatment were the CGI-S scale, applied before medication and at least four weeks after its beginning, and the CGI-I scale. Drug response was defined following the criteria used in the discovery sample. Similarly, samples were genotyped and imputed using the same platform, imputation protocol and reference panel. The resulting dataset consisted of 7,304,149 SNPs with an info score > 0.6 , a genotype call probability > 0.8 and a missing rate < 0.02 .

Potential confounders were included as covariates in the PRS model if they were associated with MPH response ($P \leq 0.05$) in the target sample (i.e., CGI-S baseline scores, use of concomitant medication and presence of phobia as comorbid condition), as well as the 10 first principal components to control for population stratification.

Meta-analysis. The eSNPs nominally associated with MPH response in the discovery sample were meta-analysed across the discovery and the target population used in the PRS analysis by the inverse-variance weighted method. The threshold for significance was set at $P \leq 1.52e-03$ under the more conservative Bonferroni correction, taking into account 33 SNPs.

Data availability. The datasets generated and/or analysed during the current study are not publicly available due to ethics constraints but are available from the corresponding author on reasonable request.

Results

Genome-wide association study in the discovery population. Subjects were predominantly male (84.4%), with an average age at assessment of 9.59 (SD = 2.91) years (range 5–17). One hundred and thirty-one participants (75.7%) met DSM-IV criteria for ADHD-combined subtype, 37 (21.4%) had ADHD-inattentive subtype and 5 (2.9%) were diagnosed with ADHD-hyperactive-impulsive subtype. Comorbid disorders were present in a modest number of patients (22.5%), the main ones being disabilities in reading and writing (12.7%),

oppositional defiant disorder (5.8%) and tic disorders (1.7%). One hundred and forty-one subjects (81.5%) responded favourably to treatment according to the CGI-I scale, while 32 (18.5%) failed to show a clinical response to MPH. Responders and non-responders were comparable with regard to age, sex, ADHD subtype, comorbidity, use of concomitant medication, MPH dose and drug formulation ($P > 0.05$). There were significant differences, however, in the severity of symptoms as assessed by the CGI-S scale ($P < 1e-03$), with children resistant to MPH scoring higher at the baseline evaluation than children showing clinical improvement (Supplementary Table S2).

No variant reached genome-wide significance ($P < 5e-08$). However, the set of 4,709 genes containing SNPs nominally associated with MPH response ($P < 0.05$; Supplementary Table S3) was significantly enriched for candidates previously studied in ADHD or treatment outcome, with 199 out of 436 being present in this category (ratio = 0.46; $P_{B-H} = 1.56e-31$).

Identification of candidate causal SNPs and *cis*-expression quantitative trait loci analysis. Considering these results, we prioritised the SNPs with P -values below 0.05 based on functional annotation and eQTL analysis rather than focusing on the top significant hits. Eight hundred and ninety-six independent markers were selected as candidate causal variants by functional annotation (Supplementary Table S4) and were subjected to further *cis*-eQTL analysis on a pre-existing dataset of 193 neuropathologically normal human cortical samples²³. After imputation and quality control, a total of 284 variants and 300 genes with detectable expression levels in at least 75% of the samples were available for 146 individuals. Of these, we identified 33 SNPs tagging *cis*-eQTL in 32 different loci (referred to as eGenes), with eight SNP-gene pairs surpassing the 0.05 false discovery rate (FDR) threshold: rs12302749-*SPSB2*, $P_{FDR} = 1.13e-05$; rs1061115-*PYROXD2*, $P_{FDR} = 2.17e-04$; rs2071421-*ARSA*, $P_{FDR} = 7.26e-04$; rs11553441-*RRP7A*, $P_{FDR} = 7.26e-04$; rs4902333-*CHURC1*, $P_{FDR} = 7.26e-04$; rs17279558-*GGH*, $P_{FDR} = 0.013$; rs9901673-*SEN3*, $P_{FDR} = 0.023$; and rs17685420-*PEBP4*, $P_{FDR} = 0.041$ (Table 1).

Functional and pathway enrichment analysis. The set of 32 eGenes included three candidates previously investigated in ADHD, namely *ALDH1L1*³⁴, *CDH23*³⁵ and *CMTM8*³⁶ (ratio = 0.007; $P_{B-H} = 0.023$), and showed over-representation of genes implicated in abnormal morphology of molecular layer of cerebellum ($P_{B-H} = 0.012$), abnormal morphology of white matter ($P_{B-H} = 0.012$), morphology of axons ($P_{B-H} = 0.012$), morphology and length of neurites ($P_{B-H} = 0.012$ and $P_{B-H} = 0.021$, respectively), coordination ($P_{B-H} = 0.022$), and formation of hippocampus ($P_{B-H} = 0.033$). Interestingly, categories related to neurological diseases, psychological disorders and behaviour were also significantly enriched, including learning deficit ($P_{B-H} = 0.012$), hyperactive behaviour ($P_{B-H} = 0.015$) and spatial learning ($P_{B-H} = 0.018$) (Table 2).

Polygenic risk score analysis and meta-analysis using the target population. Finally, in order to assess the predictive value of our findings we first computed PRS derived from the present GWAS in an independent sample of ADHD adult patients for whom data on response to MPH were available. The demographic and clinical characteristics of the target population according to the response status are presented in Supplementary Table S5. Briefly, 85.2% of subjects ($n = 161$) were classified as responders, while 14.8% ($n = 28$) exhibited a reduced or lack of improvement. Responders and non-responders significantly differed with regard to CGI-S baseline scores, use of concomitant medication and presence of phobia as comorbid condition, and thus these additional risk factors were entered as covariates in the PRS model, as well as the 10 first principal components to control for population stratification. Since we did not detect significant results at any of the predefined P -value thresholds, we subsequently focused on the 33 eSNPs nominally associated with treatment outcome in the discovery sample and we increased statistical power by performing a meta-analysis across the discovery and the target population. Sixteen suggestive signals were identified (Table 3). Among them, 15 revealed the same direction of effect, with rs17685420 in the *PEBP4* gene being significant after Bonferroni correction (OR = 3.07 (1.76–5.35), $P = 7.90e-05$), followed by additional compelling markers such as rs2071421 within *ARSA* (OR = 2.63 (1.29–5.37), $P = 7.71e-03$), rs2886059 in *ALDH1L1* (OR = 2.30 (1.14–4.66), $P = 0.020$), and rs17712523 in *CDH23* (OR = 2.13 (1.07–4.24), $P = 0.031$).

Discussion

To our knowledge, this is the first study investigating the genetic basis of MPH response from an integrative perspective that combines GWAS data, functional annotation, eQTL in relevant tissues to ADHD and pathway enrichment analyses. Our results highlight genes related to nervous system development and function, neurological diseases and psychological disorders. Thus, this comprehensive strategy provides a better understanding of the molecular mechanisms implicated in MPH treatment effects and suggests promising candidates that may contribute to clinical outcome.

In our attempt to improve earlier genetic studies by bridging the gap between genotype and phenotype, we prioritised the nominally significant SNPs based on functional annotation and *cis*-eQTL analysis in human brain, and we identified three candidates previously investigated in ADHD: *ALDH1L1*³⁴, *CDH23*³⁵ and *CMTM8*³⁶. Of these, *CMTM8* showed overlapping association between adult ADHD and bipolar disorder³⁶, and *ALDH1L1*, which yielded suggestive results in the present meta-analysis of MPH response, has been related to other neuropsychiatric conditions such as major depressive disorder or schizophrenia^{37,38}. In addition, the *ALDH1L1* locus was found among the top hits of a GWAS conducted on children and adolescents with ADHD³⁴ and contains non-synonymous rare variants identified through whole-exome sequencing in an ADHD nuclear family³⁹. Similarly, *CDH23* harbours one of the top SNPs from a pooling-based GWA of adult ADHD³⁵ and reached nominal significance in our meta-analysis. *CDH23* is a member of the cadherin superfamily that mediates calcium-dependent cell-cell adhesion. The activity of cadherins depends on their anchorage to the neuronal cytoskeleton through proteins termed catenins (e.g., CTNNA2), which in turn activate KALRN, a key regulator

Gene	Chr ^a	Start base ^b	Stop base ^c	SNP	SNP base ^d	Risk allele	OR (95% CI)	GWAS P-value	Beta	eQTL P-value	eQTL adjusted P-value (FDR) ^e
SPSB2	12	6870935	6873357	rs12302749	6867132	T	2.31 (1.22–4.39)	0.011	0.115	3.34e-08	1.13e-05
PYROXD2	10	98383565	98415221	rs1061115	98417292	G	2.23 (1.13–4.41)	0.021	-0.088	1.28e-06	2.17e-04
ARSA	22	50622754	50628173	rs2071421	50625988	T	2.56 (1.06–6.22)	0.037	0.104	8.26e-06	7.26e-04
RRP7A	22	42508335	42519823	rs11553441	42516091	C	3.13 (1.15–8.54)	0.026	0.177	1.04e-05	7.26e-04
CHURC1	14	64914361	64935368	rs4902333	64909368	T	2.37 (1.24–4.51)	8.73e-03	0.116	1.07e-05	7.26e-04
GGH	8	63015079	63039051	rs17279558	63015187	C	3.61 (1.12–11.7)	0.032	0.130	2.38e-04	0.013
SEN3	17	7561992	7571969	rs9901673	7580783	A	3.95 (1.79–8.71)	6.53e-04	0.052	4.66e-04	0.023
PEBP4	8	22713251	22941095	rs17685420	22927888	T	2.87 (1.38–5.94)	4.62e-03	-0.073	9.72e-04	0.041
STRBP	9	123109494	123268576	rs9032	123104493	C	2.28 (1.07–4.85)	0.033	0.071	2.15e-03	0.081
ETFDH	4	158672101	158708713	rs11559290	158680524	C	2.08 (1.01–4.28)	0.048	-0.048	2.57e-03	0.087
CORO7	16	4354542	4416961	rs3810818	4382028	A	2.10 (1.13–3.94)	0.020	-0.053	3.17e-03	0.098
FXR2	17	7591230	7614897	rs9901675	7581494	A	4.12 (1.32–12.9)	0.015	0.130	3.84e-03	0.107
NFIB	9	14081843	14398983	rs7858	14087770	C	2.89 (1.02–8.19)	0.045	-0.055	4.12e-03	0.107
ALDH1L1	3	126103561	126181526	rs2886059	126146923	C	2.73 (1.04–7.14)	0.041	-0.078	5.31e-03	0.129
OPCML	11	132403361	133532983	rs751655	132623600	C	3.08 (1.18–8.02)	0.022	-0.063	7.43e-03	0.158
PURA	5	140114123	140119416	rs2013169	140118020	T	3.32 (1.23–9.01)	0.018	0.071	7.45e-03	0.158
ZDHHC7	16	84974460	85011732	rs3210967	84975857	C	2.09 (1.11–3.94)	0.023	0.056	8.03e-03	0.160
WRB	21	39380287	39397889	rs3761372	39371919	T	3.38 (1.39–8.22)	7.36e-03	0.071	8.54e-03	0.161
FARP2	2	241356249	241494842	rs757978	241431686	C	5.18 (1.19–22.6)	0.029	0.062	0.010	0.181
SEN3	17	7561992	7571969	rs11552708	7559238	A	3.81 (1.50–9.72)	5.05e-03	0.041	0.011	0.189
ZNF565	19	36182060	36215084	rs4805162	36183403	G	2.24 (1.19–4.22)	0.012	0.034	0.016	0.255
ESYT2	7	158730998	158829628	rs1061735	158733764	G	2.91 (1.10–7.67)	0.031	0.030	0.017	0.255
HTT	4	3074510	3243960	rs362272	3233253	G	2.40 (1.06–5.42)	0.035	-0.033	0.019	0.276
CMTM8	3	32238679	32370325	rs4627790	32259860	C	1.98 (1.07–3.68)	0.030	0.054	0.021	0.298
ZNF134	19	57614219	57624717	rs10413455	57620255	A	5.75 (1.35–24.4)	0.018	0.061	0.024	0.323
PDIA2	16	283118	287209	rs1048786	286916	C	3.55 (1.19–10.6)	0.023	-0.087	0.027	0.345
PIGM	1	160027672	160031993	rs12409352	160030645	A	2.67 (1.00–7.12)	0.049	0.029	0.032	0.395
TRIB3	20	380629	397559	rs2295490	388261	G	2.06 (1.06–4.00)	0.033	0.092	0.034	0.406
ZNF211	19	57633167	57644046	rs10420097	57633193	G	7.29 (1.82–29.3)	5.18e-03	0.084	0.038	0.439
ARHGAP12	10	31805398	31928876	rs2799018	31913141	T	1.89 (1.00–3.56)	0.049	-0.036	0.039	0.446
ARHGFE28	5	73626158	73941993	rs929740	73621913	G	2.52 (1.31–4.84)	5.40e-03	-0.037	0.042	0.453
CDH23	10	71396934	71815947	rs17712523	71777857	G	2.61 (1.05–6.48)	0.039	-0.073	0.045	0.475
ELP5	17	7252053	7259940	rs4562	7260420	A	2.22 (1.24–3.95)	6.95e-03	-0.031	0.048	0.497

Table 1. *Cis*-associated gene-SNP pairs with a nominal significant effect on methylphenidate response in the GWAS analysis. Note: SNP, single-nucleotide polymorphism; GWAS, genome-wide association study; Chr, gene chromosomal location; OR, odds ratio; CI, confidence interval; eQTL, expression quantitative trait loci. ^{a,b,c,d}All relative to the human reference genome GRCh38 (NCBI Build 38). ^eSignificance threshold for the False Discovery Rate (FDR) correction at $P < 0.05$.

of dendritic spine development and synaptic plasticity underlying learning and memory⁴⁰. This is of particular interest since catenin-cadherin cell-adhesion complexes are important in cerebellar and hippocampal lamination⁴¹ and both *CTNNA2* and *KALRN* have shown nominal associations with clinical outcome in our GWAS. In this sense, Park *et al.*⁴¹ demonstrated that mice lacking the actin-binding domain of Ctnna2 (*cdf*-mutant mice) exhibited abnormal morphology of cerebellum and hippocampus. Moreover, the *cdf*-mutant mice showed an impaired control of the startle response and deficits in startle modulation have also been found in ADHD patients^{42,43}. Therefore, cell-adhesion molecules and regulators of synaptic plasticity may play a role in MPH treatment effects, which is in agreement with data from genome-wide linkage and association studies pointing to cadherin13 (*CDH13*) as one of the most consistent candidates implicated in ADHD pathophysiology. Specifically, *CDH13* was detected in three independent GWAS^{34,35,44} and lies within the 16q22-16q24 region identified in a meta-analysis of seven ADHD linkage scans⁴⁵. Furthermore, SNPs in this gene have been linked to defects in verbal working memory and hyperactive/impulsive symptoms in subjects with ADHD^{46,47}, addiction vulnerability and drug dependence (e.g., methamphetamine, alcohol, and nicotine)^{48,49}.

Pathway enrichment analysis provided further evidence for neuroplastic changes in response to MPH treatment, considering the over-representation of genes involved in morphology of neurons, neuroglia, white matter and brain regions relevant to ADHD (e.g., cerebellum, cerebral cortex, and hippocampus) that we found among eGenes associated with drug response. Our results are in accordance to a wealth of data from neuroimaging studies showing that unmedicated ADHD patients present cortical thickness and reduced white matter volume in several areas of the brain compared to healthy subjects, while medicated children do not differ from control group^{50–53}. In addition to structural alterations, ADHD patients exhibit deficits in neural functioning, which may

Categories	Diseases or functions annotation	Adjusted P-value (Benjamini-Hochberg) ^a	Molecules
Nervous System Development and Function, Organ Morphology, Organismal Development	abnormal morphology of molecular layer of cerebellum	0.012	ARSA, PURA
Nervous System Development and Function, Organ Morphology, Tissue Morphology	abnormal morphology of white matter	0.012	ARSA, PURA
Cellular Development, Embryonic Development, Organismal Development	differentiation of neuronal progenitor cells	0.012	FXR2, HTT
Developmental Disorder, Neurological Disease	learning deficit	0.012	ARSA, HTT
Cell Morphology, Nervous System Development and Function, Organ Morphology, Organismal Development, Tissue Morphology	morphology of granule cells	0.012	HTT, NFIB
Cell Morphology, Haematological System Development and Function, Nervous System Development and Function	morphology of microglia	0.012	ARSA, HTT
Neurological Disease	gait disturbance	0.012	ARSA, HTT, PURA
Cell Morphology, Nervous System Development and Function, Tissue Morphology	morphology of axons	0.012	ARSA, HTT, PURA
Cell Morphology, Nervous System Development and Function	morphology of neuroglia	0.012	ARSA, HTT, NFIB
Cell Morphology, Nervous System Development and Function, Organ Morphology, Organismal Development	morphology of brain cells	0.012	ARSA, HTT, NFIB, PURA
Cell Morphology, Nervous System Development and Function, Tissue Morphology	morphology of neurites	0.012	ARSA, FARP2, HTT, PURA
Cell Morphology, Nervous System Development and Function, Tissue Morphology	morphology of neurons	0.012	ARSA, CDH23, FARP2, HTT, NFIB, PURA
Neurological Disease	late-onset encephalopathy	0.014	ARSA, HTT
Psychological Disorders	hyperactive behaviour	0.015	ARSA, FXR2, HTT
Neurological Disease	tremor	0.015	ARSA, HTT, PURA
Nervous System Development and Function, Organ Morphology, Organismal Development	abnormal morphology of dentate gyrus	0.015	NFIB, PURA
Cell Morphology, Nervous System Development and Function, Organ Morphology, Organismal Development, Tissue Morphology	abnormal morphology of Purkinje cells	0.015	ARSA, PURA
Cell Death and Survival, Cellular Compromise, Neurological Disease, Organismal Injury and Abnormalities, Tissue Morphology	neurodegeneration of Purkinje cells	0.015	ARSA, HTT
Nervous System Development and Function, Organ Morphology, Organismal Development	abnormal morphology of telencephalon	0.015	ARSA, HTT, NFIB
Behaviour	spatial learning	0.018	ARSA, FXR2, HTT
Nervous System Development and Function, Organ Morphology, Organismal Development	mass of brain	0.019	HTT, PURA
Cell Morphology, Cellular Function and Maintenance, Nervous System Development and Function, Tissue Morphology	length of neurites	0.021	FARP2, HTT
Organismal Injury and Abnormalities	abnormality of head	0.022	HTT, NFIB
Nervous System Development and Function	coordination	0.022	ARSA, FXR2, HTT
Cellular Development	differentiation of stem cells	0.022	FXR2, HTT, NFIB
Developmental Disorder, Neurological Disease, Organismal Injury and Abnormalities	cerebral dysgenesis	0.022	NFIB, PURA
Nervous System Development and Function, Organ Morphology, Organismal Development	morphology of cerebral cortex	0.023	HTT, NFIB, PURA
Organismal Development	size of head	0.024	HTT, NFIB, PURA
Neurological Disease, Organismal Injury and Abnormalities	astrocytosis	0.025	ARSA, HTT
Cell Death and Survival, Cellular Compromise, Neurological Disease, Tissue Morphology	neurodegeneration of axons	0.026	ARSA, HTT
Cellular Growth and Proliferation, Nervous System Development and Function, Organ Development	proliferation of brain cells	0.030	HTT, PURA
Nervous System Development and Function, Organ Morphology, Organismal Development	abnormal morphology of brain	0.030	ARSA, HTT, NFIB, PURA
Embryonic Development, Organismal Development, Tissue Development	mesoderm development	0.032	CHURC1, HTT
Embryonic Development, Nervous System Development and Function, Organ Development, Organismal Development, Tissue Development	formation of hippocampus	0.033	HTT, NFIB
Nervous System Development and Function, Organ Morphology, Tissue Morphology	quantity of brain cells	0.042	HTT, PURA
Nervous System Development and Function	sensation	0.047	CDH23, FXR2, HTT

Table 2. Significantly enriched biological functions and diseases identified by Ingenuity Pathway Analysis within the eGenes associated with methylphenidate response. Note: eGenes, genes whose expression levels are associated with at least one genetic variant. ^aSignificance threshold for the Benjamini-Hochberg correction at $P < 0.05$.

SNP	Chr ^a	SNP base ^b	Risk allele	SPAIN		BRAZIL		META-ANALYSIS		Gene
				OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value ^c	
rs17685420	8	22927888	T	2.87 (1.38–5.94)	4.62e-03	3.38 (1.43–8.01)	5.71e-03	3.07 (1.76–5.35)	7.90e-05	PEBP4
rs3210967	16	84975857	C	2.09 (1.11–3.94)	0.023	2.25 (1.02–4.94)	0.044	2.15 (1.31–3.52)	2.40e-03	ZDHC7
rs10413455	19	57620255	A	5.75 (1.35–24.4)	0.018	3.86 (0.63–23.7)	0.144	4.93 (1.59–15.3)	5.70e-03	ZNF134
rs2071421	22	50625988	T	2.56 (1.06–6.22)	0.037	2.76 (0.84–9.15)	0.096	2.63 (1.29–5.37)	7.71e-03	ARSA
rs12302749	12	6867132	T	2.31 (1.22–4.39)	0.011	1.49 (0.72–3.10)	0.280	1.91 (1.18–3.09)	8.48e-03	SPSB2
rs10420097	19	57633193	G	7.29 (1.82–29.3)	5.18e-03	1.58 (0.14–17.7)	0.712	4.98 (1.49–16.6)	9.13e-03	ZNF211
rs3810818	16	4382028	A	2.10 (1.13–3.94)	0.020	1.40 (0.62–3.16)	0.413	1.81 (1.10–2.97)	0.019	CORO7
rs2886059	3	126146923	C	2.73 (1.04–7.14)	0.041	1.89 (0.67–5.33)	0.230	2.30 (1.14–4.66)	0.020	ALDH1L1
rs9901675	17	7581494	A	4.12 (1.32–12.9)	0.015	1.57 (0.33–7.46)	0.572	2.95 (1.18–7.39)	0.021	FXR2
rs4805162	19	36183403	G	2.24 (1.19–4.22)	0.012	1.21 (0.59–2.50)	0.608	1.72 (1.07–2.76)	0.026	ZNF565
rs4562	17	7260420	A	2.22 (1.24–3.95)	6.95e-03	1.05 (0.51–2.15)	0.889	1.65 (1.05–2.59)	0.029	ELP5
rs17712523	10	7177857	G	2.61 (1.05–6.48)	0.039	1.63 (0.57–4.66)	0.366	2.13 (1.07–4.24)	0.031	CDH23
rs2799018	10	31913141	T	1.89 (1.00–3.56)	0.049	1.40 (0.66–2.97)	0.375	1.67 (1.03–2.71)	0.038	ARHGAP12
rs12409352	1	160030645	A	2.67 (1.00–7.12)	0.049	1.63 (0.54–4.95)	0.387	2.15 (1.03–4.49)	0.041	PIGM
rs4902333	14	64909368	T	2.37 (1.24–4.51)	8.73e-03	0.94 (0.41–2.18)	0.893	1.68 (1.01–2.80)	0.046	CHURC1
rs2295490	20	388261	G	2.06 (1.06–4.00)	0.033	1.22 (0.48–3.13)	0.678	1.73 (1.01–2.98)	0.048	TRIB3
rs4627790	3	32259860	C	1.98 (1.07–3.68)	0.030	1.13 (0.52–2.45)	0.761	1.59 (0.98–2.59)	0.060	CMTM8
rs1048786	16	286916	C	3.55 (1.19–10.6)	0.023	1.15 (0.38–3.48)	0.805	2.03 (0.93–4.43)	0.074	PDIA2
rs9901673	17	7580783	A	3.95 (1.79–8.71)	6.53e-04	0.21 (0.054–0.77)	0.019	1.82 (0.92–3.59)	0.084	SEN3
rs751655	11	132623600	C	3.08 (1.18–8.02)	0.022	0.99 (0.37–2.62)	0.986	1.76 (0.89–3.49)	0.104	OPCML
rs11559290	4	158680524	C	2.08 (1.01–4.28)	0.048	1.03 (0.39–2.74)	0.957	1.62 (0.90–2.90)	0.105	ETFDH
rs7858	9	14087770	C	2.89 (1.02–8.19)	0.045	1.12 (0.41–3.09)	0.820	1.78 (0.86–3.67)	0.119	NFIB
rs929740	5	73621913	G	2.52 (1.31–4.84)	5.40e-03	0.69 (0.34–1.41)	0.313	1.40 (0.87–2.27)	0.169	ARHGEF28
rs9032	9	123104493	C	2.28 (1.07–4.85)	0.033	0.71 (0.25–2.01)	0.515	1.52 (0.82–2.81)	0.179	STRBP
rs11552708	17	7559238	A	3.81 (1.50–9.72)	5.05e-03	0.11 (0.020–0.62)	0.012	1.70 (0.75–3.86)	0.207	SEN3
rs1061735	7	158733764	G	2.91 (1.10–7.67)	0.031	0.79 (0.32–1.98)	0.618	1.46 (0.75–2.84)	0.265	ESYT2
rs11553441	22	42516091	C	3.13 (1.15–8.54)	0.026	0.74 (0.29–1.90)	0.529	1.46 (0.73–2.90)	0.284	RRP7A
rs362272	4	3233253	G	2.40 (1.06–5.42)	0.035	0.72 (0.31–1.68)	0.451	1.34 (0.75–2.41)	0.324	HTT
rs757978	2	241431686	C	5.18 (1.19–22.6)	0.029	0.74 (0.22–2.42)	0.613	1.59 (0.63–4.01)	0.325	FARP2
rs17279558	8	63015187	C	3.61 (1.12–11.7)	0.032	0.37 (0.081–1.74)	0.210	1.56 (0.62–3.97)	0.348	GGH
rs3761372	21	39371919	T	3.38 (1.39–8.22)	7.36e-03	0.65 (0.30–1.39)	0.268	1.31 (0.73–2.33)	0.365	WRB
rs1061115	10	98417292	G	2.23 (1.13–4.41)	0.021	0.58 (0.28–1.24)	0.161	1.22 (0.74–2.02)	0.438	PYROXD2
rs2013169	5	140118020	T	3.32 (1.23–9.01)	0.018	0.28 (0.11–0.73)	9.33e-03	0.92 (0.46–1.84)	0.813	PURA

Table 3. Meta-analysis of the eSNPs nominally associated with methylphenidate response across the discovery and the target population. Note: eSNP, single-nucleotide polymorphism associated with cortical expression levels; Chr, gene chromosomal location; OR, odds ratio; CI, confidence interval. ^{a,b}All relative to the human reference genome GRCh38 (NCBI Build 38). ^cSignificance threshold for Bonferroni correction at $P \leq 1.52e-03$.

be normalised by MPH. In this sense, Rubia *et al.*^{54–56} demonstrated that MPH restores the aberrant activation and functional connectivity in attention, motivation and interference inhibition networks, as well as during error processing, thus improving neuropsychological performance of subjects with ADHD.

It should also be noted that 15 out of the 32 eGenes included in the pathway enrichment analysis harboured variants which provided preliminary evidence for an association with clinical outcome across the discovery and an independent sample. Our top hit from the meta-analysis, rs17685420, is located in the phosphatidylethanolamine binding protein 4 (PEBP4), a member of an evolutionary conserved family of proteins with pivotal biological functions such as cell proliferation and survival, stimulation of acetylcholine synthesis and inhibition of serine proteases⁵⁷. Given that serine proteases are implicated in many processes during development and tissue homeostasis (e.g., neuronal outgrowth, cell migration, and cell death), disturbances in their activity on the nervous system have been proposed as a possible pathological mechanism for neurological disorders⁵⁸. Indeed, Hohman *et al.*⁵⁹ identified a gene-gene interaction involving *PEBP4* associated with late onset Alzheimer's disease (AD) across 13 independent datasets, and decreased expression levels have been found in hippocampus of both AD patients and mouse models for another phosphatidylethanolamine binding protein, the PEBP1^{60–62}, which has also shown alterations after methamphetamine and morphine administration^{63,64}. Additional compelling results were detected for *ARSA*, *SPSB2*, *CORO7* and *PIGM*. The *ARSA* gene encodes the arylsulfatase A, whose deficiency is characterised by decline in school performance, emergence of behavioural problems and neurologic symptoms, such as cerebellar ataxia, among others⁶⁵. *SPSB2* has been associated with borderline personality disorder in a genome-wide methylation analysis⁶⁶ and *CORO7*, which has shown to be important in brain development⁶⁷, was identified as a novel candidate gene for emotionality by comparing the expression profile of two mouse lines

with either high or low anxiety-related behaviour⁶⁸. Finally, mutations in the *PIGM* gene, which encodes a protein involved in the synthesis of the glycosylphosphatidylinositol anchor, have been reported in individuals with severe neurological features, including seizures, muscular hypotonia and intellectual disability⁶⁹.

Another interesting finding arising from our research is the significant enrichment for candidates previously related to ADHD or MPH response detected among the set of genes nominally associated with treatment outcome. It is worth mentioning that four of these candidates, namely *CTNNA2* (rs79067553, $P = 3.51e-05$), *PARD3B* (rs62172701, $P = 3.28e-04$), *LRP1B* (rs410870, $P = 4.00e-04$) and *GRM7* (rs17047590, $P = 6.36e-04$), were significant at $P < 1e-03$ in the present GWAS analysis. In particular, the metabotropic glutamate receptor 7 (*GRM7*), which is widely expressed in brain regions relevant to ADHD such as the cerebral cortex, the hippocampus and the cerebellum^{51,70} and has been associated with the disorder^{71–73}, was also found among the top hits in a prior GWAS of MPH efficacy¹³, thus supporting the role of the glutaminergic system as a moderator of treatment outcome.

The main strengths of our design include the coverage of a considerably higher number of genetic variants in comparison with the study from Mick *et al.*¹³ (319,722 vs 3,566,199 markers), the use of an integrative approach that combines GWAS data with bioinformatic methods, and the follow up of our top signals in an independent cohort, which did increase the association of a number of markers located in loci with biologically plausible functions (*PEBP4*, *ARSA*, and *SPSB2*). Nevertheless, some limitations should also be considered when interpreting these results. Given the limited sample size, the present study might not be sufficiently powered to detect individual variants of modest effects and we did not identify any loci reaching the genome-wide threshold. This constraint, however, is heavily conditioned on the difficulty to find the required phenotype as shown by the sample size of the studies included in the last meta-analysis of candidate gene-based investigations on MPH response⁷⁴. The small dimension of our paediatric sample could also explain the lack of significance of the PRS derived from the GWAS results in an independent population of ADHD adult patients. Alternatively, this discrepancy may be attributed to differences in the genetic background and the clinical heterogeneity (e.g., comorbidities, frequency of clinical subtypes, and sex ratio) of ADHD among children and adults, as suggested by most of the pharmacogenetic studies conducted in adult samples, which failed to replicate variants previously identified in children and adolescents⁷⁵. Additional methodological aspects or distinct environmental influences between the discovery and the target population may also be responsible for the absence of association.

In conclusion, despite not reaching any genome-wide significant association, our results are consistent with previous findings and highlight genes related to morphological abnormalities in brain regions important for motor control, attention and memory, thus supporting the use of bioinformatic and biological evidence as a complement to GWAS data to disentangle the genetic basis of MPH response.

References

1. American Psychiatric Association. *Diagnostic And Statistical Manual Of Mental Disorders, 5th Edition*. (American Psychiatric Publishing Association, 2013).
2. Polanczyk, G. V., Willcutt, E. G., Salum, G. A., Kieling, C. & Rohde, L. A. ADHD prevalence estimates across three decades: an updated systematic review and meta-regression analysis. *Int J Epidemiol.* **43**, 434–442 (2014).
3. Doshi, J. A. *et al.* Economic impact of childhood and adult attention-deficit/hyperactivity disorder in the United States. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* **51**, 990–1002 e2 (2012).
4. Le, H. H. *et al.* Economic impact of childhood/adolescent ADHD in a European setting: the Netherlands as a reference case. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* **23**, 587–598 (2014).
5. Faraone, S. V. & Mick, E. Molecular genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr Clin North Am.* **33**, 159–180 (2010).
6. Blum, N. J., Jawad, A. F., Clarke, A. T. & Power, T. J. Effect of osmotic-release oral system methylphenidate on different domains of attention and executive functioning in children with attention-deficit-hyperactivity disorder. *Dev Med Child Neurol.* **53**, 843–849 (2011).
7. Greenhill, L. *et al.* Guidelines and algorithms for the use of methylphenidate in children with Attention-Deficit/ Hyperactivity Disorder. *J Atten Disord.* **6**(Suppl 1), S89–100 (2002).
8. Charach, A., Ickowicz, A. & Schachar, R. Stimulant treatment over five years: adherence, effectiveness, and adverse effects. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* **43**, 559–567 (2004).
9. Wolraich, M. L. & Doffing, M. A. Pharmacokinetic considerations in the treatment of attention-deficit hyperactivity disorder with methylphenidate. *CNS Drugs.* **18**, 243–250 (2004).
10. Wilens, T. E. Effects of methylphenidate on the catecholaminergic system in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychopharmacol.* **28**, S46–53 (2008).
11. Kieling, C., Genro, J. P., Hutz, M. H. & Rohde, L. A. A current update on ADHD pharmacogenomics. *Pharmacogenomics.* **11**, 407–419 (2010).
12. Bruxel, E. M. *et al.* ADHD pharmacogenetics across the life cycle: New findings and perspectives. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* **165B**, 263–282 (2014).
13. Mick, E., Neale, B., Middleton, F. A., McGough, J. J. & Faraone, S. V. Genome-wide association study of response to methylphenidate in 187 children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* **147B**, 1412–1418 (2008).
14. Mick, E., McGough, J. J., Middleton, F. A., Neale, B. & Faraone, S. V. Genome-wide association study of blood pressure response to methylphenidate treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* **35**, 466–472 (2011).
15. Pagerols, M. *et al.* Pharmacogenetics of methylphenidate response and tolerability in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pharmacogenomics J.* **17**, 98–104 (2017).
16. Guy, W. *ECDEU Assessment Manual For Psychopharmacology, Revised*. (US Department of Health, Education and Welfare, 1976).
17. Miller, S. A., Dykes, D. D. & Polesky, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* **16**, 1215 (1988).
18. Purcell, S. *et al.* PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet.* **81**, 559–575 (2007).
19. Xu, Z. & Taylor, J. A. SNPinfo: integrating GWAS and candidate gene information into functional SNP selection for genetic association studies. *Nucleic Acids Res.* **37**, W600–605 (2009).
20. Elnitski, L. *et al.* Distinguishing regulatory DNA from neutral sites. *Genome Res.* **13**, 64–72 (2003).

21. Elnitski, L., Jin, V. X., Farnham, P. J. & Jones, S. J. Locating mammalian transcription factor binding sites: a survey of computational and experimental techniques. *Genome Res.* **16**, 1455–1464 (2006).
22. King, D. C. *et al.* Evaluation of regulatory potential and conservation scores for detecting cis-regulatory modules in aligned mammalian genome sequences. *Genome Res.* **15**, 1051–1060 (2005).
23. Myers, A. J. *et al.* A survey of genetic human cortical gene expression. *Nat Genet.* **39**, 1494–1499 (2007).
24. Shabalin, A. A. Matrix eQTL: ultra fast eQTL analysis via large matrix operations. *Bioinformatics.* **28**, 1353–1358 (2012).
25. Zhang, L. *et al.* ADHDgene: a genetic database for attention deficit hyperactivity disorder. *Nucleic Acids Res.* **40**, D1003–1009 (2012).
26. Asherson, P. & Gurling, H. Quantitative and molecular genetics of ADHD. *Curr Top Behav Neurosci.* **9**, 239–272 (2012).
27. Bonvicini, C., Faraone, S. V. & Scassellati, C. Attention-deficit hyperactivity disorder in adults: A systematic review and meta-analysis of genetic, pharmacogenetic and biochemical studies. *Mol Psychiatry.* **21**, 872–884 (2016).
28. Froehlich, T. E., McGough, J. J. & Stein, M. A. Progress and promise of attention-deficit hyperactivity disorder pharmacogenetics. *CNS Drugs.* **24**, 99–117 (2010).
29. Gao, Q., Liu, L., Qian, Q. & Wang, Y. Advances in molecular genetic studies of attention deficit hyperactivity disorder in China. *Shanghai Arch Psychiatry.* **26**, 194–206 (2014).
30. Hawi, Z. *et al.* The molecular genetic architecture of attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry.* **20**, 289–297 (2015).
31. Li, Z., Chang, S. H., Zhang, L. Y., Gao, L. & Wang, J. Molecular genetic studies of ADHD and its candidate genes: a review. *Psychiatry Res.* **219**, 10–24 (2014).
32. Euesden, J., Lewis, C. M. & O'Reilly, P. F. PRSice: Polygenic Risk Score software. *Bioinformatics.* **31**, 1466–1468 (2015).
33. Contini, V. *et al.* Adrenergic α 2A receptor gene is not associated with methylphenidate response in adults with ADHD. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* **261**, 205–211 (2011).
34. Neale, B. M. *et al.* Case-control genome-wide association study of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* **49**, 906–920 (2010).
35. Lesch, K. P. *et al.* Molecular genetics of adult ADHD: converging evidence from genome-wide association and extended pedigree linkage studies. *J Neural Transm (Vienna).* **115**, 1573–1585 (2008).
36. Weber, H. *et al.* Cross-disorder analysis of bipolar risk genes: further evidence of DGKH as a risk gene for bipolar disorder, but also unipolar depression and adult ADHD. *Neuropsychopharmacology.* **36**, 2076–2085 (2011).
37. Barley, K., Dracheva, S. & Byne, W. Subcortical oligodendrocyte- and astrocyte-associated gene expression in subjects with schizophrenia, major depression and bipolar disorder. *Schizophr Res.* **112**, 54–64 (2009).
38. Kurian, S. M. *et al.* Identification of blood biomarkers for psychosis using convergent functional genomics. *Mol Psychiatry.* **16**, 37–58 (2011).
39. Lyon, G. J. *et al.* Exome sequencing and unrelated findings in the context of complex disease research: ethical and clinical implications. *Discov Med.* **12**, 41–55 (2011).
40. Penzes, P. & Jones, K. A. Dendritic spine dynamics—a key role for kalirin-7. *Trends Neurosci.* **31**, 419–427 (2008).
41. Park, C., Falls, W., Finger, J. H., Longo-Guess, C. M. & Ackerman, S. L. Deletion in *Catna2*, encoding alpha N-catenin, causes cerebellar and hippocampal lamination defects and impaired startle modulation. *Nat Genet.* **31**, 279–284 (2002).
42. Conzelmann, A. *et al.* Methylphenidate normalizes emotional processing in adult patients with attention-deficit/hyperactivity disorder: preliminary findings. *Brain Res.* **1381**, 159–166 (2011).
43. Conzelmann, A. *et al.* Methylphenidate and emotional-motivational processing in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Neural Transm (Vienna).* **123**, 971–979 (2016).
44. Lasky-Su, J. *et al.* Genome-wide association scan of quantitative traits for attention deficit hyperactivity disorder identifies novel associations and confirms candidate gene associations. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* **147B**, 1345–1354 (2008).
45. Zhou, K. *et al.* Meta-analysis of genome-wide linkage scans of attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* **147B**, 1392–1398 (2008).
46. Arias-Vasquez, A. *et al.* *CDH13* is associated with working memory performance in attention deficit/hyperactivity disorder. *Genes Brain Behav.* **10**, 844–851 (2011).
47. Salatino-Oliveira, A. *et al.* *Cadherin-13* gene is associated with hyperactive/impulsive symptoms in attention/deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* **168B**, 162–169 (2015).
48. Drgon, T. *et al.* Genome-wide association for nicotine dependence and smoking cessation success in NIH research volunteers. *Mol Med.* **15**, 21–27 (2009).
49. Treutlein, J. & Rietschel, M. Genome-wide association studies of alcohol dependence and substance use disorders. *Curr Psychiatry Rep.* **13**, 147–155 (2011).
50. Castellanos, F. X. *et al.* Developmental trajectories of brain volume abnormalities in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *JAMA.* **288**, 1740–1748 (2002).
51. Cortese, S. The neurobiology and genetics of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD): what every clinician should know. *Eur J Paediatr Neurol.* **16**, 422–433 (2012).
52. Hoogman, M. *et al.* Subcortical brain volume differences in participants with attention deficit hyperactivity disorder in children and adults: a cross-sectional mega-analysis. *Lancet Psychiatry.* **4**, 310–319 (2017).
53. Kasperek, T., Theiner, P. & Filova, A. Neurobiology of ADHD From Childhood to Adulthood: Findings of Imaging Methods. *J Atten Disord.* **19**, 931–943 (2015).
54. Rubia, K. *et al.* Methylphenidate normalises activation and functional connectivity deficits in attention and motivation networks in medication-naïve children with ADHD during a rewarded continuous performance task. *Neuropharmacology.* **57**, 640–652 (2009).
55. Rubia, K. *et al.* Methylphenidate normalizes fronto-striatal underactivation during interference inhibition in medication-naïve boys with attention-deficit hyperactivity disorder. *Neuropsychopharmacology.* **36**, 1575–1586 (2011).
56. Rubia, K., Halari, R., Mohammad, A. M., Taylor, E. & Brammer, M. Methylphenidate normalizes frontocingulate underactivation during error processing in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry.* **70**, 255–262 (2011).
57. He, H. *et al.* Phosphatidylethanolamine binding protein 4 (PEBP4) is a secreted protein and has multiple functions. *Biochim Biophys Acta.* **1863**, 1682–1689 (2016).
58. Hengst, U., Albrecht, H., Hess, D. & Monard, D. The phosphatidylethanolamine-binding protein is the prototype of a novel family of serine protease inhibitors. *J Biol Chem.* **276**, 535–540 (2001).
59. Hohman, T. J. *et al.* Discovery of gene-gene interactions across multiple independent data sets of late onset Alzheimer disease from the Alzheimer Disease Genetics Consortium. *Neurobiol Aging.* **38**, 141–150 (2016).
60. George, A. J. *et al.* A serial analysis of gene expression profile of the Alzheimer's disease Tg2576 mouse model. *Neurotox Res.* **17**, 360–379 (2010).
61. George, A. J. *et al.* Decreased phosphatidylethanolamine binding protein expression correlates with Abeta accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* **27**, 614–623 (2006).
62. Maki, M. *et al.* Decreased expression of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein mRNA in the hippocampus in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* **61**, 176–185 (2002).
63. Kobeissy, F. H. *et al.* Psychoproteomic analysis of rat cortex following acute methamphetamine exposure. *J Proteome Res.* **7**, 1971–1983 (2008).
64. Wei, Q. H. *et al.* Involvement of hippocampal phosphatidylethanolamine-binding protein in morphine dependence and withdrawal. *Addict Biol.* **18**, 230–240 (2013).

65. Lugowska, A. *et al.* A homozygote for the c.459+1G>A mutation in the ARSA gene presents with cerebellar ataxia as the only first clinical sign of metachromatic leukodystrophy. *J Neurol Sci.* **338**, 214–217 (2014).
66. Prados, J. *et al.* Borderline personality disorder and childhood maltreatment: a genome-wide methylation analysis. *Genes Brain Behav.* **14**, 177–188 (2015).
67. Rybakin, V. *et al.* Coronin 7, the mammalian POD-1 homologue, localizes to the Golgi apparatus. *FEBS Lett.* **573**, 161–167 (2004).
68. Czibere, L. *et al.* Profiling trait anxiety: transcriptome analysis reveals cathepsin B (Ctsb) as a novel candidate gene for emotionality in mice. *PLoS One.* **6**, e23604 (2011).
69. Krawitz, P. M. *et al.* PGAP2 mutations, affecting the GPI-anchor synthesis pathway, cause hyperphosphatasia with mental retardation syndrome. *Am J Hum Genet.* **92**, 584–589 (2013).
70. Makoff, A., Pilling, C., Harrington, K. & Emson, P. Human metabotropic glutamate receptor type 7: molecular cloning and mRNA distribution in the CNS. *Brain Res Mol Brain Res.* **40**, 165–170 (1996).
71. Elia, J. *et al.* Genome-wide copy number variation study associates metabotropic glutamate receptor gene networks with attention deficit hyperactivity disorder. *Nat Genet.* **44**, 78–84 (2011).
72. Park, S. *et al.* Association between the GRM7 rs3792452 polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder in a Korean sample. *Behav Brain Funct.* **9**, 1 (2013).
73. Yang, L. *et al.* Polygenic transmission and complex neuro developmental network for attention deficit hyperactivity disorder: genome-wide association study of both common and rare variants. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* **162B**, 419–430 (2013).
74. Myer, N. M., Boland, J. R. & Faraone, S. V. Pharmacogenetics predictors of methylphenidate efficacy in childhood ADHD. *Mol Psychiatry.* E-pub ahead of print 12 December. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.234> (2017).
75. Contini, V. *et al.* Pharmacogenetics of response to methylphenidate in adult patients with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD): a systematic review. *Eur Neuropsychopharmacol.* **23**, 555–560 (2013).

Acknowledgements

We are grateful to patients from the Hospital Universitari Vall d'Hebron and the Adult ADHD Outpatient Clinic of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, who kindly participated in this research. Genotyping was performed at the Stanley Center for Psychiatric Research, Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, Massachusetts, United States of America. Statistical analyses were carried out on the Genetic Cluster Computer (<http://www.geneticcluster.org>) hosted by SURFsara and financially supported by the Netherlands Scientific Organization (NWO 480-05-003 PI: Posthuma) along with a supplement from the Dutch Brain Foundation and the VU University Amsterdam. Over the course of this investigation, M.P. has been a recipient of a pre-doctoral fellowship from the Vall d'Hebron Research Institute (PRED-VHIR-2013) and a research grant from the Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD), Germany (Research Grants - Short-Term Grants, 2017). C.S.M. is a recipient of a Sara Borrell contract and a mobility grant from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III (CD15/00199 and MV16/00039). M.S.A. is a recipient of a contract from the Biomedical Network Research Centre on Mental Health (CIBERSAM), Madrid, Spain. P.R. is a recipient of a pre-doctoral fellowship from the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR), Generalitat de Catalunya, Spain (2016FI_B 00899). I.G.M. is a recipient of a contract from the 7th Framework Programme for Research, Technological Development and Demonstration, European Commission (AGGRESSOTYPE_FP7HEALTH2013/602805). E.C.S. is a recipient of a pre-doctoral fellowship from the Collaborative Research Training Programme for Medical Doctors (PhD4MD), Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona (IRB Barcelona), Spain (II14/00018). M.R. is a recipient of a Miguel de Servet contract from the Instituto de Salud Carlos III, Spain (CP09/00119 and CP115/00023). This work was funded by Fundación Alicia Koplowitz and Instituto de Salud Carlos III (PI12/01139, PI14/01700, PI15/01789, PI16/01505), and co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF), Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca-AGAUR, Generalitat de Catalunya, Spain (2014SGR1357, 2014SGR0932), Ministerio de Economía y Competitividad, Spain (SAF2015-68341-R), the European College of Neuropsychopharmacology (ECNP network: 'ADHD across the lifespan'), Departament de Salut, Generalitat de Catalunya, Spain, and a NARSAD Young Investigator Grant from the Brain & Behavior Research Foundation. The research leading to these results has received funding from the European Union H2020 Programme [H2020/2014-2020] under grant agreements Nos. 667302 (CoCA) and 643051 (MiND).

Author Contributions

M.P., C.S.M., P.R. and I.G.M. participated in the DNA isolation and preparation of samples. M.P., C.S.M., P.R., M.S.A., I.G.M., B.S.S. and N.R.M. undertook the statistical analyses. V.R., E.C.S., M.C., M.M.V. and E.H.G. contributed to the clinical assessment and recruitment of patients. L.A.R., C.H.D.B., Prof. M.C. and J.A.R.Q. participated in the study design, clinical assessment and coordination of the clinical research. M.R. conceived the project, wrote the protocol and coordinated the study design and the statistical analyses. B.C., J.A.R.Q. and M.R. supervised the project and the manuscript preparation. All authors contributed to and have approved the final version.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20194-7>.

Competing Interests: E.H.G. has served on the speakers' bureau and has received travel grants from Shire and Novartis. He has also been on the advisory board and acted as a consultant for Shire. L.A.R. has served on the speakers' bureau, acted as a consultant and received grant or research support from Eli Lilly and Co., Janssen-Cilag, Medice, Novartis, and Shire. The ADHD and Juvenile Bipolar Disorder Outpatient Programs chaired by L.A.R. have received unrestricted educational and research support from the following pharmaceutical companies: Eli Lilly and Co., Janssen-Cilag, Novartis, and Shire. L.A.R. has received travel grants from Shire to take part in the 2014 APA, 2015 WFADHD and 2016 AACAP congresses. He has received royalties from Artmed Editora and Oxford University Press. Prof. M.C. has received travel grants and research support from Eli Lilly and Co., Janssen-Cilag, Shire, and Laboratorios Rubió. He has been on the advisory board and served

as a consultant for Eli Lilly and Co., Janssen-Cilag, Shire, and Laboratorios Rubió. J.A.R.Q. has served on the speakers' bureau and acted as a consultant for Eli Lilly and Co., Janssen-Cilag, Novartis, Lundbeck, Shire, Ferrer, and Laboratorios Rubió. He has received travel awards from Eli Lilly and Co., Janssen-Cilag, and Shire for participating in psychiatric meetings. The ADHD Program chaired by J.A.R.Q. has received unrestricted educational and research support from Eli Lilly and Co., Janssen-Cilag, Shire, Rovi, and Laboratorios Rubió in the past two years. The remaining authors declare no conflict of interest.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

Discussió

1. Principals resultats i discussió general

- 1.1. Bases genètiques del TDAH i de la resposta farmacològica al MPH
- 1.2. Influència de l'ambient en la gravetat i farmacologia del TDAH
- 1.3. Consideracions metodològiques
- 1.4. Perspectives de futur

1. PRINCIPALS RESULTATS I DISCUSSIÓ GENERAL

La present tesi doctoral s'ha centrat, per una banda, en l'estudi dels processos etiològics implicats en el TDAH i, per l'altra, en la identificació de marcadors genètics de la resposta i la tolerabilitat al principal fàrmac utilitzat per al tractament del trastorn, el MPH.

Els resultats derivats del primer estudi suggereixen una associació entre el TDAH i el receptor dopaminèrgic D4. A més, palesen la influència dels esdeveniments vitals adversos en la gravetat de la simptomatologia, tant de forma aïllada com en interacció amb els genotips de *DRD4*.

L'estudi 2 estén la contribució del sistema dopaminèrgic als efectes terapèutics del MPH i assenyalen, novament, l'existència d'interrelacions entre els factors genètics i ambientals.

Finalment, el darrer estudi farmacogenètic proporciona evidències preliminars sobre la participació de gens relacionats amb el desenvolupament i funció del sistema nerviós, les malalties neurològiques i els trastorns psicològics, a través d'una estratègia integradora que combina resultats de GWAS amb dades biològiques i bioinformàtiques.

Els resultats obtinguts en els diferents estudis que conformen la tesi doctoral es discuteixen detalladament a continuació.

1.1. Bases genètiques del TDAH i de la resposta farmacològica al MPH

L'actual treball ha contribuït a establir els mecanismes moleculars subjacents al TDAH i la resposta farmacològica al MPH a través de la identificació de *loci* genètics implicats en el sistema dopaminèrgic i el neurodesenvolupament.

1.1.1. Implicació del sistema dopaminèrgic

L'estudi 1 de la present tesi doctoral revela la contribució de *DRD4* en el TDAH, un gen altament expressat en regions cerebrals involucrades en l'atenció, la memòria, el processament del llenguatge i la inhibició (Noaín et al., 2006). En concret, la variant 7R, identificada com a factor de risc, ha estat associada consistentment amb el trastorn, tant en individus infantils com adults, a través de diverses meta-anàlisis (Faraone, Doyle, Mick i Biederman, 2001; Gizer et al., 2009; Li, Sham, Owen i He, 2006; Nikolaidis i Gray, 2010).

A part dels resultats derivats de la recerca genètica, la implicació del sistema dopaminèrgic en la fisiopatologia del TDAH recolza en múltiples evidències provinents de models animals, estudis farmacològics i de neuroimatge (Genro et al., 2010). Així, per exemple, les investigacions en rosegadors han demostrat que l'administració neonatal de 6-hidroxidopamina indueix un descens en els nivells de dopamina, fet que es tradueix en comportaments hiperactius, dèficits de memòria i d'aprenentatge (Archer et al., 1988). De forma similar, altres models animals caracteritzats per presentar una funció dopaminèrgica disminuïda, com la rata SHR (de l'anglès *spontaneously hypertensive rat*) o el ratolí mutant coloboma, també exhibeixen hiperactivitat, impulsivitat i/o dificultats per mantenir l'atenció (Hess, Jinnah, Kozak i Wilson, 1992; Leo et al., 2003; Raber et al., 1997; Russell, 2000; Sagvolden, 2000).

Per altra banda, els estudis de neuroimatge estructural realitzats en pacients amb TDAH evidencien alteracions morfològiques en àrees frontoestriatals i regions com l'hipocamp, el cerebel, els ganglis basals o l'amígdala, encarregades, entre d'altres, de l'atenció, planificació, organització, memòria i control de les emocions i els moviments (Cortese, 2012; Hoogman et al., 2017; Kasperek, Theiner i Filova, 2015). Tenint en compte que es tracta de regions riques en dopamina, aquestes observacions reforcen la teoria que atribueix els símptomes del TDAH a un dèficit del neurotransmissor en àrees específiques del cervell (Levy, 1991). A nivell funcional, a més, s'ha observat una menor activació dels circuits frontoestriatals durant la realització de tasques cognitives, un increment de la densitat del transportador de dopamina a l'estriat i una disminució dels receptors dopaminèrgics D2 i D3 (Durstun, 2003; Spencer et al., 2005; Teicher et al., 2000; Volkow et al., 2007).

Finalment, els fàrmacs, com el MPH, que inhibeixen la recaptació de dopamina i n'augmenten la disponibilitat a l'espai sinàptic, redueixen de forma efectiva les manifestacions clíniques del trastorn. Per aquest motiu, es considera que, a més de conferir susceptibilitat al TDAH, la variabilitat genètica en el sistema de neurotransmissió dopaminèrgica pot condicionar els efectes del tractament farmacològic per al trastorn. En aquest sentit, la recerca farmacogenètica del MPH s'ha centrat de forma quasi exclusiva en gens suposadament relacionats amb el mecanisme d'acció del fàrmac, entre els quals destaquen *SLC6A3*, *DRD4* i *COMT*. No obstant això, els resultats aportats pels 'candidats clàssics' han estat majoritàriament negatius o discordants, segons una revisió dels estudis farmacogenètics realitzats en pacients infantils i adults amb TDAH (Bruxel et al., 2014). Per contra, l'estudi 2 de l'actual tesi doctoral ha permès identificar *DRD3*, *DBH*, *TH* i *DRD2*

com a moduladors potencials dels efectes terapèutics del MPH, uns gens fins ara poc estudiats però que representen candidats raonables donada la seva distribució i funció reguladora dins del sistema dopaminèrgic.

Els enzims codificats per *TH* i *DBH* es troben implicats en la síntesi i degradació de la dopamina, respectivament. Per tant, és presumible que les variants funcionals en aquests gens alterin els nivells de neurotransmissor disponible a l'espai sinàptic i repercuteixin en la resposta al tractament. El paper de *DBH* recolza en l'associació identificada tant amb la tolerabilitat com amb la resposta clínica, avaluada a través de dues escales diferents (CGI-I i CGI-S). Tanmateix, aquestes observacions contrasten amb les de l'única investigació anterior en què s'avaluà sense èxit els efectes de *DBH* sobre la resposta al MPH (Contini et al., 2012). El gen *TH*, en canvi, no ha estat prèviament explorat en estudis farmacogenètics, malgrat les evidències sobre la seva associació amb el TDAH (Li et al., 2014). Pel que fa als receptors dopaminèrgics, la implicació de *DRD3* en l'eficàcia clínica concorda amb els resultats de McCracken i els seus col·laboradors, els quals relacionaren aquest gen amb la millora dels símptomes hiperactius/impulsius que experimenten els nens amb TEA després del tractament amb MPH (McCracken et al., 2014). L'estudi 2, a més, vincula el risc d'aparició d'efectes adversos amb la variabilitat a *DRD2* i reforça, així, l'associació prèviament detectada per aquests autors (McCracken et al., 2014).

Per altra banda, convé destacar la presència de *DRD2* i *DRD3* en regions del cervell fonamentals per al control dels moviments, la cognició i les emocions. Concretament, s'han detectat nivells elevats o moderats d'aquests receptors a la formació hipocàmpica, una estructura pertanyent al sistema límbic que inclou l'hipocamp, el gir dentat i el subicle (Bahena-Trujillo, Flores i Arias-Montaño, 2000; Jackson i Westlind-Danielsson, 1994). El receptor D2 es troba també en altres àrees del còrtex cerebral, juntament amb *DRD1* i *DRD4*, mentre que *DRD3* s'expressa de forma abundant a les cèl·lules de Purkinje del cerebel (Jaber, Robinson, Missale i Caron, 1996; Jackson i Westlind-Danielsson, 1994; Missale, Nash, Robinson, Jaber i Caron, 1998; O'Dowd, 1993). El cerebel, a més, conté els subtipus de receptors D1 i D5, malgrat que aquest últim s'observa predominantment a l'hipocamp, on exerceix un paper destacat en la formació de la memòria (Faraone et al., 2014; Jaber et al., 1996; Jackson i Westlind-Danielsson, 1994; Missale et al., 1998). La distribució dels receptors dopaminèrgics resulta especialment interessant si es tenen en compte els resultats de l'estudi 3 en què l'associació amb la resposta al MPH s'analitzà a través d'una estratègia consistent en integrar dades de GWAS amb evidències biològiques i bioinformàtiques. En

particular, l'anàlisi d'enriquiment de vies revelà una sobrerrepresentació de gens involucrats en la morfologia de la capa molecular del cerebel, les cèl·lules de Purkinje, el gir dentat o el còrtex cerebral, i la formació de l'hipocamp. Aquests resultats concorden amb les dades procedents dels estudis de neuroimatge i, per tant, suggereixen un possible mecanisme molecular subjacent a les alteracions estructurals observades en pacients amb TDAH (Castellanos et al., 2002; Cortese, 2012; Hoogman et al., 2017; Kasperek et al., 2015). A més, les variants funcionals en gens relacionats amb la morfologia i funció del cerebel i l'hipocamp podrien comprometre el correcte desenvolupament d'aquestes regions, riques en dopamina, i modificar, en conseqüència, la neurotransmissió dopaminèrgica. En aquest sentit, estudis en animals demostren que la neurodegeneració i pèrdua cel·lular a nivell de l'hipocamp, el gir dentat i/o el cerebel indueix canvis en la síntesi, alliberament i senyalització de la dopamina, així com símptomes motors i cognitius (Bernert, Hoeger, Mosgoeller, Stolzlechner i Lubec, 2003; Ferguson, 1996; Ferguson, Paule i Holson, 1996; Kohlhauser, Mosgoeller, Hoeger, Lubec i Lubec, 1999; Loidl et al., 1994; Pletnikov, Rubin, Vogel, Moran i Carbone, 2002a, 2002b). Concretament, la irradiació neonatal de l'hipocamp en rates, utilitzada com a model de TDAH, produeix una marcada disminució de les cèl·lules granulars al gir dentat, una menor estimulació de l'activitat adenilat ciclase per part de la dopamina, i comportaments hiperactius o dèficits d'aprenentatge i memòria, que milloren amb l'administració de dexamfetamina (Altman, 1987; Chronister, Palmer i Gerbrandt, 1980; Gazzara i Altman, 1981; Highfield, Hu i Amsel, 1998).

En definitiva, la present tesi doctoral ha contribuït a establir els mecanismes moleculars implicats en el TDAH i la resposta al MPH a través de la identificació de *loci* genètics que, de forma directa o indirecta, afecten la neurotransmissió dopaminèrgica en regions del cervell fonamentals per al control dels moviments, la cognició i les emocions.

1.1.2. Implicació de gens del neurodesenvolupament

Tal com s'ha comentat, a més de les alteracions en la senyalització dopaminèrgica, el darrer estudi farmacogenètic suggereix la participació de gens relacionats amb l'estructura i funció del sistema nerviós, uns resultats que reafirmen la importància del neurodesenvolupament en la fisiopatologia del TDAH. D'entre ells, un dels més prometedors és el de la glicoproteïna d'adhesió cel·lular CDH23, pertanyent a la superfamília de les cadherines, ja que inclou un dels SNP més significatius d'un GWAS sobre el TDAH a l'adulthood (Lesch et al., 2008). L'activitat de les cadherines depèn del seu ancoratge al citoesquelet neuronal a

través d'unes proteïnes anomenades catenines (p. e., *CTNNA2*), les quals s'encarreguen d'activar *KALRN*, un regulador clau per al desenvolupament d'espines dendrítiques i la plasticitat sinàptica subjacent a l'aprenentatge i la memòria (Penzes i Jones, 2008). A més, els complexos d'adhesió cel·lular formats per les cadherines i les catenines exerceixen una important funció en la laminació del cerebel i l'hipocamp (Park, Falls, Finger, Longo-Guess i Ackerman, 2002), dues regions cerebrals amb alteracions morfològiques en pacients amb TDAH (Castellanos et al., 2002; Cortese, 2012; Hoogman et al., 2017; Kasperek et al., 2015). En aquest sentit, convé destacar que tant *CTNNA2* com *KALRN* mostraren associacions nominals amb la resposta clínica en el present GWAS. Per tant, és presumible que les molècules d'adhesió cel·lular i els reguladors de la plasticitat sinàptica modulin també els efectes del tractament amb MPH, especialment si es tenen en compte els estudis de lligament i d'associació a escala genòmica en què s'assenyala la cadherina 13 (*CDH13*) com un dels candidats implicats de forma més consistent en la fisiopatologia del TDAH (Lasky-Su, Neale et al., 2008; Lesch et al., 2008; Neale, Medland, Ripke, Anney et al., 2010; Zhou et al., 2008). Per altra banda, els SNP en el gen *CDH13* s'han relacionat amb defectes en la memòria de treball verbal i els símptomes hiperactius/impulsius en pacients amb TDAH (Arias-Vásquez et al., 2011; Salatino-Oliveira et al., 2015), així com amb la susceptibilitat a l'addicció i la dependència a drogues com la metamfetamina, l'alcohol o la nicotina (Drgon et al., 2009; Treutlein i Rietschel, 2011).

L'anàlisi d'enriquiment de vies aportà evidències addicionals sobre els possibles canvis neuroplàstics induïts pel tractament amb MPH donada la sobrerepresentació de gens implicats, entre d'altres, en la diferenciació de cèl·lules mares i progenitors neuronals, la morfologia de les neurones, la micròglia o la neuròglia, la llargada de les neurites o la quantitat de cèl·lules cerebrals. Aquests resultats es troben en línia amb la sobreexpressió de gens relacionats amb processos com la formació, maduració i estabilitat de noves connexions neurals observada a nivell estriatal en rates tractades amb MPH durant l'adolescència (Adriani et al., 2006). De forma similar, estudis anteriors en diferents espècies ja havien demostrat que l'administració de MPH induïa canvis en els nivells de gens d'expressió ràpida, com els factors de transcripció *c-fos* i *Egr1* o el factor de plasticitat sinàptica *Homer 1a*, al llarg de regions cerebrals potencialment implicades en el TDAH (Brandon i Steiner, 2003; Chase et al., 2003; Chase et al., 2005; Lin et al., 1996; Penner et al., 2002; Trinh et al., 2003; Yano i Steiner, 2005a, 2005b). A més, s'ha observat una major densitat d'espines dendrítiques a les neurones MSN-D1 i MSN-D2 (de l'anglès *medium spiny neurons*

expressing dopamine D1 and D2 receptors, respectivament) del nucli accumbens, una llargada i complexitat superior de les dendrites al còrtex cingulat anterior dorsal i un nombre més elevat de neurones de nova formació al gir dentat com a conseqüència del tractament amb MPH en rosegadors (Elia, Laracy, Allen, Nissley-Tsiopinis i Borgmann-Winter, 2012; Lee et al., 2012; Zehle, Bock, Jezierski, Gruss i Braun, 2007).

Per altra banda, els resultats obtinguts a l'estudi 3 són consistents amb els GWAS realitzats en pacients amb TDAH, els quals suggereixen la participació de gens implicats en processos biològics com l'adhesió i divisió cel·lular, la migració neuronal, la formació i creixement de neurites o la neurogènesi (Banaschewski et al., 2010; Franke et al., 2009; Hawi et al., 2015; Poelmans et al., 2011). Aquest fet, juntament amb l'enriquiment en candidats prèviament relacionats amb el TDAH que es detectà entre els gens amb variants nominalment associades a la resposta clínica, reforça la potencial utilitat dels estudis farmacogenètics en elucidar els mecanismes moleculars subjacents al trastorn.

1.2. Influència de l'ambient en la gravetat i farmacologia del TDAH

L'actual treball mostra la influència dels esdeveniments vitals estressants i el consum matern de tabac durant l'embaràs en la gravetat del TDAH a l'edat adulta i la resposta clínica al MPH de la descendència, respectivament, tant de forma aïllada com en interacció amb factors genètics de risc.

1.2.1. Esdeveniments vitals estressants

Els factors ambientals com l'adversitat psicosocial poden exercir una influència destacable en l'etiologia del TDAH. Així, per exemple, s'han descrit diverses circumstàncies (nivell sociocultural baix, ingressos econòmics escassos, conflictes familiars, estils educatius dels pares, negligència, abús, maltractament infantil, etc.) que tendeixen a incrementar el risc de presentar TDAH i que sovint contribueixen a agreujar-ne les manifestacions (Banerjee et al., 2007; De Sanctis et al., 2012; Ellis i Nigg, 2009; Freitag et al., 2012; Thapar et al., 2012). En línia amb aquestes observacions, a l'estudi 1 de la present tesi doctoral s'identificaren correlacions positives entre el nombre d'experiències estressants durant la infantesa i la gravetat de la simptomatologia a l'edat adulta.

Malgrat no conèixer-se els processos pels quals les influències ambientals condueixen, anys més tard, a l'aparició de trastorns neuropsiquiàtrics, es considera que els mecanismes epigenètics podrien exercir un rol determinant com a mediadors (Hamza et al., 2017; Lesch, 2011). Aquest tipus de modificacions, entre les quals destaquen la metilació de l'ADN i la modificació post-traducciona de les histones (p. e., fosforilació, acetilació, metilació i ubiquitinació), modulen l'expressió gènica sense alterar la seqüència de nucleòtids (Hamza et al., 2017). De fet, diversos estudis demostren que l'exposició a determinats tòxics ambientals, com el tabac, els PCB o els metalls pesants, indueix canvis en els nivells de metilació de l'ADN i de modificació de les histones (Hamza et al., 2017).

Pel que fa als factors psicosocials, és presumible que els canvis epigenètics afectin l'eix hipotàlem-hipòfisi-adrenal (HPA, de l'anglès *hypothalamic-pituitary-adrenal*), principal responsable de regular la resposta i adaptació a l'estrès (Gudsnuk i Champagne, 2012). Aquest sistema s'inicia amb la síntesi i alliberament de l'hormona alliberadora de corticotropina (CRH, de l'anglès *corticotropin-releasing hormone*) per part de les neurones parvocel·lulars del nucli paraventricular de l'hipotàlem. La CRH assoleix la hipòfisi, a través del sistema portal hipofisari, on estimula l'alliberament de corticotropina (ACTH, de l'anglès *adrenocorticotropic hormone*) a la circulació sistèmica. Finalment, l'ACTH actua sobre l'escorça adrenal i estimula la secreció de glucocorticoides, els quals s'uneixen a receptors situats, entre d'altres, a l'hipocamp i inhibeixen la síntesi de CRH per mitjà d'un mecanisme de *feedback* negatiu (Hackman, Farah i Meaney, 2010; Kapoor, Petropoulos i Matthews, 2008; Kelly i Fudge, 2018). Ara bé, l'activació excessiva de l'eix HPA com a conseqüència de l'exposició crònica a situacions estressants (p. e., maltractament, abús, negligència, etc.) altera aquest control inhibitori i condueix, per tant, a una hipersecreció de CRH i a nivells elevats de glucocorticoides circulants.

En aquest sentit, les investigacions en animals han permès evidenciar de forma sistemàtica que la qualitat de la cura materna, expressada a través de la freqüència amb què llepen i empolainen les seves cries, modifica els sistemes que regulen la resposta a l'estrès en la descendència, fet que es tradueix en canvis en el comportament. Concretament, les cries que reben una menor atenció per part de la mare presenten, a l'edat adulta, nivells elevats de CRH i una expressió hipocàmica disminuïda del gen *Nr3c1* que codifica el receptor de glucocorticoides (Caldji et al., 1998; Francis, Diorio, Liu i Meaney, 1999; Liu et al., 1997; Weaver et al., 2004). Altres estudis, a més, suggereixen la participació de mecanismes epigenètics en els efectes observats atès que la regió promotora del gen *Nr3c1* es troba

hipermetilada en aquestes cries, fet que impedeix la unió del factor de transcripció NGFI-A (de l'anglès *nerve growth factor-inducible protein A*) (Weaver et al., 2004; Weaver et al., 2007) (Figura 9). De forma similar, McGowan i els seus col·laboradors associaren l'abús infantil en humans amb una major metilació del promotor de *NR3C1* i amb la consegüent disminució de l'expressió del receptor de glucocorticoïdes a nivell de l'hipocamp (McGowan et al., 2009).

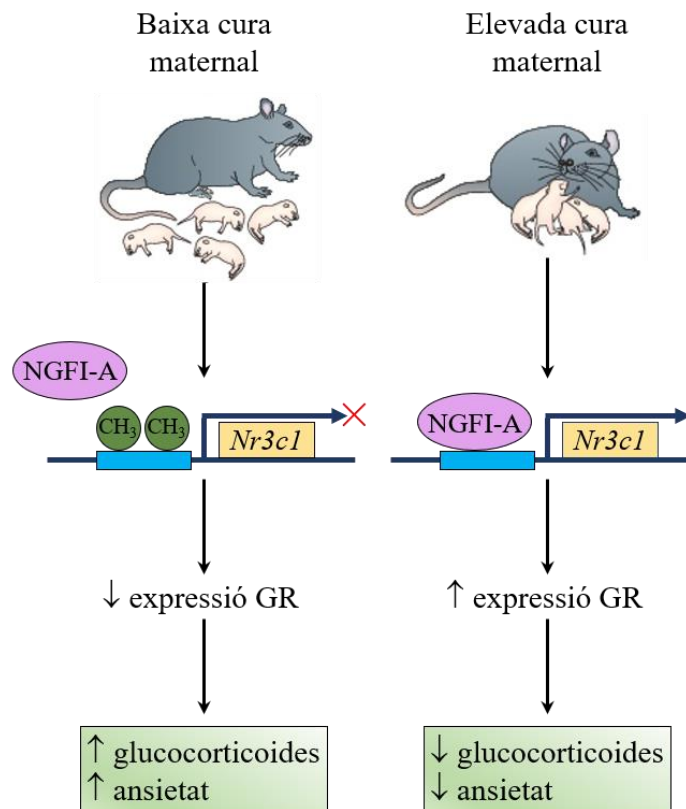


Figura 9. Efecte del comportament de la mare vers les cries en la regulació de l'eix HPA (adaptació de Hackman et al., 2010).
Nota: GR, receptor de glucocorticoïdes.

Per altra banda, el sistema monoaminèrgic també exerceix un paper fonamental en la regulació de la resposta a l'estrès (Joëls i Baram, 2009). Concretament, el sistema dopaminèrgic mesocortical, que s'activa davant d'estímuls estressants, afavoreix el retorn a la normalitat dels nivells plasmàtics de glucocorticoïdes i, per tant, actua com a mecanisme compensatori o de *feedback* negatiu amb l'objectiu d'evitar l'activació excessiva de l'eix HPA (Sullivan, 2004; Sullivan i Dufresne, 2006). A més, donada la rellevància de la via mesocortical en la cognició i regulació de les emocions, es considera que la seva disfunció pot ocasionar dificultats per dirigir l'atenció i controlar o planificar la conducta (Sagvolden, Johansen, Aase i Russell, 2005).

Així doncs, les alteracions en el sistema dopaminèrgic podrien explicar les diferències individuals en la vulnerabilitat a l'adversitat que condueixen al desenvolupament de trastorns psiquiàtrics. D'acord amb aquesta hipòtesi, nombroses investigacions han demostrat que la variant 7R de *DRD4*, que presenta una resposta disminuïda a la dopamina (Asghari et al., 1995), és capaç de modificar la resposta individual a determinats factors psicosocials i d'afavorir l'aparició de comportaments exterioritzats (p. e., oposicionistes, agressius) i problemes de conducta quan es dona en interacció amb circumstàncies estressants com la manca de sensibilitat o l'hostilitat materna, l'exposició a estrès durant el període prenatal o les agressions entre companys (Bakermans-Kranenburg i van Ijzendoorn, 2006; Buchmann et al., 2014; Dilalla, Gheyara i Bersted, 2013; Schlomer et al., 2015). Pel que fa al TDAH, la recerca sobre els factors de risc psicosocial en relació a les interaccions $G \times E$ és escassa, malgrat que, fins ara, han mostrat efectes epistàtics superiors que els estressors pre i perinatal a l'hora de modular el risc del trastorn i el número de símptomes, especialment d'inatenció (Nigg, Nikolas i Burt, 2010; Pennington et al., 2009; Rosenberg, Pennington, Willcutt i Olson, 2012). D'entre les diferents anàlisis, només una ha detectat una interacció significativa que impliqui el gen *DRD4* (Martel et al., 2011). Concretament, Martel i els seus col·laboradors observaren que els nens homozigots per a l'al·lel L de la duplicació en tàndem presentaven una susceptibilitat al TDAH i als símptomes d'inatenció superior en presència d'estils educatius inconsistents i com major era el sentiment de culpa que els generaven els conflictes entre els seus pares.

La investigació realitzada en el marc de la present tesi doctoral també suggereix la capacitat de *DRD4* per regular la influència de les experiències estressants sobre el curs i gravetat del TDAH a l'edat adulta, si bé els resultats obtinguts semblen indicar un efecte protector per a la combinació al·lèlica L-7R. Aquesta aparent paradoxa podria ser deguda a diferències en les variables ambientals considerades. Martel et al. avaluaren l'estil educatiu dels pares i la percepció infantil dels conflictes conjugals, mentre que la mesura utilitzada a l'estudi 1 agrupa combinacions molt diverses de factors de risc psicosocial. L'efecte de la interacció amb *DRD4*, per tant, podria variar en funció de les influències ambientals analitzades o de l'etapa del desenvolupament, de manera que l'edat dels participants també podria justificar els resultats conflictius. En aquest sentit, els pacients adults podrien haver desenvolupat amb el temps estratègies de compensació que els permetin atenuar els dèficits ocasionats pel trastorn (problemes d'organització, oblit, ajornaments, etc.), motiu pel qual la gravetat dels seus símptomes seria menor, malgrat haver estat exposats a una major adversitat durant la

infantesa. Convindria, doncs, disposar d'informació sobre l'ús d'aquest tipus d'estratègies per part dels pacients a fi de contrastar la possibilitat que, tal i com suggereixen nombrosos estudis, els individus amb l'al·lel de risc 7R, a més de ser sensibles a la influència d'estressors ambientals, també es beneficien en major proporció de l'efecte d'intervencions psicoeducatives (Bakermans-Kranenburg, van Ijzendoorn, Pijlman, Mesman i Juffer, 2008; Beach, Brody, Lei i Philibert, 2010; Schlomer et al., 2015).

En definitiva, els resultats derivats del primer estudi palesen la influència dels esdeveniments vitals adversos en la gravetat del TDAH, tant de forma aïllada com en interacció amb els genotips de *DRD4*.

1.2.2. Exposició prenatal al tabac

L'estudi 2 de la present tesi doctoral evidencia, per primera vegada, una major resistència al tractament amb MPH en els fills de mares que fumaren durant l'embaràs. Aquesta observació, tanmateix, concorda amb nombroses investigacions epidemiològiques segons les quals l'exposició prenatal al tabac augmenta el risc de problemes cognitius i de conducta, com el TDAH, en la descendència (Button et al., 2005; Koshy et al., 2011; Langley, Rice et al., 2005; Linnet et al., 2003; Linnet et al., 2005; Silva et al., 2014; Thapar et al., 2003; Weitzman et al., 2002).

A més, estudis de neuroimatge i en models animals mostren que el consum de tabac per part de la mare afecta negativament el desenvolupament fetal del cervell i produeix canvis estables en el temps (Button, Maughan i McGuffin, 2007; Holbrook, 2016; Tiesler i Heinrich, 2014). A nivell estructural, els nens i adolescents exposats al tabac dins l'úter presenten disminucions en el gruix del còrtex frontal, temporal i parietal, i volums cerebrals inferiors, especialment en regions com el cerebel, la matèria gris cortical, l'amígdala, l'hipocamp o el cos callós (Bublitz i Stroud, 2012; El Marroun et al., 2014; Haghghi et al., 2013). Per altra banda, s'han detectat alteracions en l'activitat normal del cervell (p. e., en els ganglis basals) i en les funcions de memòria, sensorials i motores (Chang et al., 2012; Jacobsen et al., 2007; Longo, Fried, Cameron i Smith, 2014). Les evidències procedents d'aquest tipus d'estudis, per tant, estableixen una possible relació entre l'exposició prenatal al tabac i la posterior aparició de símptomes de TDAH, tenint en compte que les alteracions descrites també s'observen en pacients amb el trastorn (Castellanos et al., 2002; Cortese, 2012; Hoogman et al., 2017; Kasperek et al., 2015).

El fum del tabac conté més de quatre mil compostos químics diferents, entre els quals destaca la nicotina pels seus efectes addictius i altament tòxics. La nicotina és capaç d'accedir al compartiment fetal a través de la barrera placentària, on s'acumula en una proporció superior a la dels teixits maternals (Lambers i Clark, 1996). Aquest compost actua com a agonista dels receptors colinèrgics nicotínics (nAChR) i mimetitza els efectes de l'acetilcolina, un neurotransmissor fonamental per al desenvolupament del cervell atès que participa en la proliferació, maduració i diferenciació de múltiples tipus de cèl·lules cerebrals (Blood-Siegfried i Rende, 2010; Tiesler i Heinrich, 2014). Ara bé, a nivell prenatal, la nicotina provoca la dessensibilització dels nAChR i, per tant, altera els processos modulats per l'acetilcolina com ara la formació d'axons i dendrites, la migració de cèl·lules neuronals, la funció sinàptica i la localització de poblacions cel·lulars neuronals específiques (Blood-Siegfried i Rende, 2010; Tiesler i Heinrich, 2014). En concret, estudis en animals relacionen l'exposició gestacional a nicotina amb l'aparició de defectes en la maduració i/o migració de les cèl·lules de Purkinje cerebel·lars, així com amb la mort neuronal (Lavezzi, Corna, Repetti i Maturri, 2013; Smith, Dwoskin i Pauly, 2010).

Per altra banda, els nAChR es troben implicats en l'alliberament de neurotransmissors, motiu pel qual es considera que els problemes cognitius i de comportament presents en subjectes amb mares fumadores durant l'embaràs podrien ser deguts a alteracions en el desenvolupament del sistema catecolaminèrgic (Tiesler i Heinrich, 2014). En aquest sentit, s'ha observat que l'exposició prenatal a nicotina repercuteix de forma negativa en la funció de la noradrenalina i la dopamina ja que disminueix els nivells d'aquests neurotransmissors i suprimeix els elements presinàptics i postsinàptics necessaris per a la neurotransmissió (Cohen et al., 2005; Muneoka et al., 1997; Slikker, Xu, Levin i Slotkin, 2005). Aquestes pertorbacions podrien explicar també els efectes epistàtics observats a l'estudi 2 entre el consum matern de tabac i variants genètiques de risc a *DRD3*, *DBH* i *TH*. Donat que els enzims codificats per *TH* i *DBH* es troben implicats en la síntesi i degradació de la dopamina, respectivament, és presumible que les variants funcionals en aquests gens regulin la disponibilitat del neurotransmissor a l'espai sinàptic de forma similar a la nicotina i, per tant, repercuteixin en la resposta clínica sinèrgicament. De fet, altres investigacions han mostrat que determinats polimorfismes en gens del sistema dopaminèrgic són capaços de modificar el risc i la gravetat del TDAH quan es donen en combinació amb el consum matern de tabac (Becker et al., 2008; Kahn et al., 2003; Neuman et al., 2007) però, fins ara, cap estudi havia explorat la seva possible interacció pel que fa a la resposta al MPH. No obstant això, Thakur

i els seus col·laboradors evidenciaren una associació altament significativa entre la resposta terapèutica i SNP al transportador noradrenèrgic després d'estratificar els pacients en funció de si havien estat exposats o no a tabac abans de néixer (Thakur et al., 2012).

Malgrat les evidències existents sobre els efectes de l'exposició prenatal al tabac resulta difícil establir una relació directa amb la posterior aparició de símptomes de TDAH. En primer lloc, el consum de tabac per part de la mare durant l'embaràs es troba associat a múltiples complicacions obstètriques, com ara la prematuritat i el baix pes en néixer (Holbrook, 2016; Tiesler i Heinrich, 2014), factors que alhora confereixen risc a desenvolupar el trastorn (Banerjee et al., 2007; Thapar et al., 2013). L'aparició del TDAH, per tant, podria no estar causada per l'exposició gestacional a nicotina, sinó per altres variables amb què manté una associació. Tanmateix, pel que fa a l'estudi 2, cap de les esmentades complicacions mostrà un efecte significatiu sobre la resposta al MPH.

De forma similar, s'ha observat que les mares fumadores difereixen de les no fumadores en múltiples característiques, entre elles el nivell educatiu i socioeconòmic, l'edat o la càrrega genètica, relacionades també amb el desenvolupament de trastorns psiquiàtrics en la descendència. Per exemple, la conducta fumadora es troba amb freqüència associada al TDAH, presumptament com a resultat dels efectes beneficiosos de la nicotina sobre els símptomes d'inatenció (Lerman et al., 2001), fet que suggereix l'existència d'una base genètica compartida. El consum de tabac per part de la mare, per tant, pot estar reflectint una predisposició genètica al TDAH que doni lloc al trastorn en ser transmesa a la descendència (Button et al., 2007; Kahn et al., 2003; Neuman et al., 2007; Thapar et al., 2003). Amb l'objectiu de controlar la influència dels factors genètics o familiars, Langley i els seus col·laboradors compararen, per una banda, el risc de TDAH en fills de mares fumadores durant l'embaràs amb el d'individus amb pares fumadors. Per l'altra, avaluaren l'efecte del tabaquisme passiu en famílies amb progenitors no fumadors en què la mare es trobava exposada al tabac a l'entorn laboral o familiar. Els autors observaren que el consum matern o patern de tabac es correlacionava amb els símptomes del trastorn en la descendència, a diferència de l'exposició passiva (Langley, Heron, Smith i Thapar, 2012). Aquests resultats coincideixen amb els d'estudis anteriors en què també es qüestiona l'existència d'una relació causal entre l'exposició prenatal a nicotina i el desenvolupament de TDAH (D'Onofrio et al., 2008; Thapar et al., 2009). Per mitjà d'un disseny basat en l'ús de tècniques de reproducció assistida, Thapar et al. estudiaren la presència del trastorn en nens genèticament relacionats o no amb la mare gestant i detectaren una associació amb el consum de tabac

durant l'embaràs únicament en els primers (Thapar et al., 2009). De forma similar, el grup de D'Onofrio no observà diferències en el nombre de símptomes de TDAH entre germans que havien estat exposats o no al tabac durant la gestació (D'Onofrio et al., 2008).

El control efectiu d'aquestes variables de confusió, per tant, resulta imprescindible per a l'establiment de conclusions de causalitat definitives (Button et al., 2007; Tiesler i Heinrich, 2014). No obstant això, a l'estudi 2 no fou possible ja que no es disposava d'informació sobre la conducta fumadora dels pares, el genotip o l'historial de psicopatologia de les mares.

1.3. Consideracions metodològiques

1.3.1. Mida de la mostra

Els resultats de la present tesi doctoral han de ser interpretats tenint en consideració una sèrie d'aspectes metodològics. En primer lloc, la reduïda mida de les mostres ha dificultat la detecció d'associacions positives, especialment a nivell genòmic en què es requereixen mostres superiors als dotze mil individus per assolir el llindar de significació (Franke et al., 2012). Malgrat aquesta limitació, els procediments emprats en la selecció dels subjectes han contribuït a reduir l'heterogeneïtat entre els grups i han permès contrarestar parcialment la manca de poder estadístic. Els pacients amb TDAH van ser avaluats de forma exhaustiva per un equip clínic àmpliament experimentat en el diagnòstic del trastorn mitjançant instruments estandarditzats i estructurats. Els individus control inclosos a l'estudi 1 també foren entrevistats amb l'objectiu de descartar la presència de trets d'inatenció i hiperactivitat en la història personal o familiar. Tant els casos com els controls es reclutaren en una àrea geogràfica restringida al voltant de Barcelona i es trobaven aparellats per sexe i ètnia atès que tots eren de nacionalitat espanyola i origen caucàsic. A més, es confirmà l'absència de subestructures poblacionals mitjançant la genotipació de quaranta-vuit SNP intergènics independents localitzats a una distància mínima de 100 kb de qualsevol gen conegut (Sanchez et al., 2006) i l'anàlisi de components principals. Finalment, la mostra de pacients pediàtrics amb què es realitzaren els dos estudis farmacogenètics constitueix un grup especialment homogeni per la incipient evolució de la malaltia i pel fet de no haver estat prèviament exposats a tractaments psicoestimulants.

1.3.2. Selecció de polimorfismes

Les variants genètiques incloses en la present tesi doctoral han estat seleccionades a través de diferents estratègies. Així, l'estudi 1 es centrà en l'anàlisi de polimorfismes potencialment causals donada la seva presumpta rellevància funcional. Aquesta aproximació, tanmateix, es troba limitada per les escasses evidències disponibles sobre la implicació funcional de la majoria de variants genètiques, fet que redueix de forma substancial el nombre de polimorfismes avaluats. Per aquest motiu, a l'estudi 2 s'optà per garantir la màxima cobertura del sistema de gens candidats considerat en base a la informació proporcionada per projectes com el HapMap o 1000 Genomes sobre els patrons de LD del genoma humà. Independentment de l'estratègia de selecció utilitzada, ambdós estudis avaluaren l'efecte dels haplotips formats per múltiples marcadors no necessàriament consecutius, cosa que representa un avantatge respecte l'anàlisi de variants genètiques aïllades. Per últim, en el tercer estudi s'amplià la cobertura genètica a tot el genoma i s'incrementà considerablement el nombre de variants genètiques analitzades respecte l'únic GWAS sobre l'eficàcia del MPH realitzat anteriorment (Mick et al., 2008) a través d'un procés d'imputació (319.722 marcadors enfront de 3.566.199). Aquesta darrera aproximació, a més, es complementà amb l'ús d'informació procedent de l'anotació funcional, l'anàlisi d'eQTL en cervell humà i de l'enriquiment en funcions i vies biològiques a fi d'aprofundir en els mecanismes moleculars implicats en els efectes terapèutics del MPH.

1.3.3. Anàlisi d'interaccions gen \times ambient

Un altre aspecte destacable és l'avaluació d'interaccions $G \times E$, un fenomen a penes explorat en estudis genètics i farmacogenètics del TDAH, malgrat les nombroses evidències sobre la influència dels estressors ambientals en l'etiologia del trastorn. La mida de la mostra i el poder estadístic, que com s'ha comentat constitueixen una de les principals limitacions de l'actual tesi doctoral, resulten especialment crítics en els estudis que investiguen l'epístasi atès l'elevat nombre de comparacions establertes. Per aquest motiu, tant a l'estudi 1 com al 2 l'anàlisi es restringí únicament als gens que es trobaven associats al TDAH o a la resposta clínica, respectivament, i, per tant, no podem descartar que els altres candidats no alterin la gravetat del trastorn o els efectes del tractament farmacològic a través de la interacció amb variables ambientals. De fet, Laucht i els seus col·laboradors detectaren, en una investigació similar, una interacció significativa entre *SLC6A3* i l'adversitat psicosocial en absència d'un

efecte genètic principal sobre la simptomatologia del TDAH (Laucht et al., 2007). En aquesta mateixa línia, tampoc es pot excloure la influència de factors ambientals diferents als considerats a l'estudi 1 com ara el baix pes en néixer, els estils educatius parentals, el consum de tabac o alcohol per part de la mare durant l'embaràs o la privació institucional, tenint en compte les evidències disponibles sobre la seva interacció amb gens del sistema de neurotransmissió dopaminèrgica i adrenèrgica (Becker et al., 2008; Brookes et al., 2006; Kahn et al., 2003; Li i Lee, 2012; Neuman et al., 2007; Sonuga-Barke et al., 2009; Stevens et al., 2009; Thapar et al., 2005). Igualment, existeix la possibilitat que factors de risc prenatals, com l'estrès gestacional, o postnatals no avaluats a l'estudi 2 repercuteixin en la resposta i tolerabilitat al MPH que exhibeixen els pacients amb TDAH. En aquest sentit, Choudhry et al. revelaren una associació significativa entre *LPHN3* i l'eficàcia del tractament, únicament observable en el grup d'individus amb mares que havien experimentat un estrès mínim o lleu durant l'embaràs (Choudhry et al., 2012). Per altra banda, l'avaluació retrospectiva dels esdeveniments vitals adversos pot haver generat informes poc fiables com a resultat d'errors o biaixos a l'hora de recordar la informació amb exactitud. Així doncs, l'absència de resultats positius podria reflectir la tendència a subestimar amb el temps l'ocurrència i intensitat de certes experiències (Brusco i Watts, 2015; Hassan, 2005; Moffitt et al., 2010).

A més dels problemes associats al poder estadístic, una altra limitació important dels estudis d'interacció $G \times E$ és la dificultat de distingir les veritables epístasis de les correlacions gen-ambient ja que l'exposició a determinades circumstàncies ambientals, especialment les relacionades amb l'àmbit familiar (p. e., l'estil educatiu dels pares o el nivell socioeconòmic), es troba influïda, almenys en part, per factors genètics (Nigg, Nikolas i Burt, 2010; Pennington et al., 2009). Per exemple, és freqüent que els nens amb TDAH presentin de forma innata un temperament difícil o conflictiu, fet que pot acabar provocant reaccions negatives en els pares i l'ús de pràctiques de criança inadequades per intentar controlar el comportament del seu fill (p. e., escassa supervisió i implicació, inconsistència en la disciplina, rebuig, hostilitat, falta de suport emocional, agressivitat, càstig físic, etc.) que agreugin els símptomes del trastorn o afavoreixin l'aparició de comorbiditat (Gehricke et al., 2007; Nigg, Nikolas i Burt, 2010). En aquests casos l'exposició a esdeveniments estressants no es produeix de forma aleatòria, sinó que l'ambient en què es desenvolupa l'individu manté una associació amb l'expressió del seu genotip, de manera que es tracta d'una correlació gen-ambient en comptes d'una interacció real. Per altra banda, tal i com

s'ha comentat anteriorment, s'ha observat que la conducta fumadora es troba freqüentment associada al TDAH, fet que suggereix l'existència d'una base genètica compartida. El consum de tabac per part de la mare, per tant, pot estar reflectint una major càrrega de risc per al TDAH que doni lloc a formes més greus i resistents del trastorn en ser transmesa a la descendència (Kahn et al., 2003; Neuman et al., 2007; Thapar et al., 2003). Amb l'objectiu de discernir aquests dos processos, nombrosos estudis avaluen l'associació entre els factors de risc genètics i ambientals (Caspi et al., 2002; Caspi et al., 2003; Nigg, Nikolas i Burt, 2010); una comprovació que no fou possible en l'actual treball ja que no es disposava d'informació sobre el genotip o l'historial de psicopatologia dels progenitors. No obstant això, la manca de correlació amb un *locus* determinat no permet excloure'n completament l'existència ja que l'exposició ambiental pot estar influïda per altres marcadors genètics no avaluats (Nigg, Nikolas i Burt, 2010; Pennington et al., 2009).

1.3.4. Disseny experimental

A part de l'anàlisi d'interaccions $G \times E$, el segon estudi realitzat en el marc de la present tesi doctoral incorpora una altra millora substancial en comparació amb la majoria d'investigacions farmacogenètiques anteriors: l'avaluació de la tolerabilitat al MPH a fi d'identificar variants genètiques que alertin del risc a desenvolupar efectes adversos. Convé, tanmateix, fer referència a una sèrie de limitacions associades al disseny naturalístic de l'esmentat estudi, així com de la darrera investigació inclosa. En primer lloc, la manca d'un grup control i d'aleatorització dels individus pot haver limitat el poder de les anàlisis. De totes maneres, l'índex de resposta al MPH obtingut fou similar al d'assajos clínics controlats amb placebo (Masellis et al., 2002; McGough, 2005; Wigal, 2009). A més, es portà a terme una exhaustiva avaluació dels factors de confusió potencials (a saber, característiques demogràfiques, valors basals a l'escala CGI-S, subtipus clínic, tractament concomitant, dosi de MPH i preparació farmacèutica) per tal de minimitzar la probabilitat que les diferències entre els individus portadors i no portadors dels al·lels de risc identificats fossin atribuïbles a altres causes. En conseqüència, les variables clíniques associades a la resposta o tolerabilitat al MPH, com la gravetat inicial dels símptomes, la dosi de fàrmac, la presència de trastorns comòrbids o l'ús de medicació concomitant, s'inclogueren com a covariables en les diferents anàlisis. Per altra banda, malgrat la falta de règims de tractament estandarditzats que caracteritza els estudis naturalístics, tots els pacients foren tractats de forma similar per part d'un equip de psiquiatres experimentats amb dosis considerades òptimes per assolir un

benefici terapèutic (Montañés-Rada et al., 2009). Finalment, el fet d'administrar el MPH sense control de l'adherència terapèutica no permet establir amb seguretat la relació entre els factors genètics i la resistència al tractament. Ara bé, convé assenyalar que malgrat l'heterogeneïtat dels dissenys naturalístics i la consegüent dificultat en la interpretació dels resultats que se'n deriven, aquest tipus d'estudis són els que reproduïen de forma més fiable la pràctica clínica real a què va dirigida la farmacogenètica (Mas, Llerena, Saíz, Bernardo i Lafuente, 2012).

Pel que fa a l'estudi 3 en concret, les dimensions de la mostra no han estat suficients per detectar variants individuals amb un efecte lleu o moderat que superin el llindar de significació genòmica, un fet que resulta congruent si es tenen en compte els estudis del PGC en altres trastorns psiquiàtrics (Franke et al., 2012). No obstant això, en el cas de la resposta al MPH, aquesta limitació es troba fortament condicionada per la dificultat d'obtenir el fenotip d'interès, tal i com es desprèn de la mida de les mostres incloses en l'última meta-anàlisi realitzada amb investigacions de gens candidats (Myer et al., 2017). Les dimensions de la nostra mostra pediàtrica també podrien justificar l'absència de significació de les puntuacions de risc poligènic derivades del GWAS en una població independent de pacients adults amb TDAH. Per contra, i a pesar dels esforços per uniformitzar els protocols metodològics de manera que ambdues mostres fossin el més comparables possibles, aquesta discrepància pot deure's a diferències en la càrrega genètica i a l'heterogeneïtat clínica del trastorn al llarg del desenvolupament, tal i com suggereixen la majoria d'estudis farmacogenètics realitzats en adults, incapços de replicar les variants prèviament identificades en mostres de nens i adolescents (Contini et al., 2013). Per exemple, els pacients infantils i adults difereixen considerablement en el perfil de comorbiditats, la freqüència dels subtipus clínics i la distribució entre sexes, variables que han demostrat influir els efectes i compliment del tractament amb MPH (Bruxel et al., 2014; Contini et al., 2013; Rovaris et al., 2014). A més, d'acord amb les observacions dels estudis 1 i 2 de la present tesi doctoral, una explicació alternativa als resultats discordants podria ser la regulació diferencial dels efectes genètics exercida per circumstàncies ambientals específiques de la població de descobriment i la població diana. Malgrat tot, la meta-anàlisi realitzada amb les dues mostres reforça l'associació identificada en la població de descobriment per a quinze dels trenta-tres eSNP considerats, alguns d'ells, localitzats en candidats plausibles, tenint en compte les seves funcions biològiques i implicació en el TDAH.

1.4. Perspectives de futur

Els resultats dels estudis que conformen l'actual tesi doctoral aporten informació innovadora i rellevant al camp de l'etiologia i la farmacogenètica del TDAH. Per una banda, les evidències generades a través de l'anàlisi d'interaccions $G \times E$ ofereixen la possibilitat d'implementar mesures de promoció de la salut, com ara l'evitació de factors ambientals de risc, amb l'objectiu de prevenir el desenvolupament del trastorn o la persistència a l'edat adulta en persones susceptibles genèticament, així com de millorar el pronòstic amb el tractament farmacològic. Per altra banda, la identificació de marcadors genètics implicats en la resposta i la tolerabilitat al MPH contribuirà a l'establiment d'una teràpia més personalitzada i al disseny de noves estratègies terapèutiques més eficaces i segures basades en el coneixement dels mecanismes moleculars subjacents al trastorn.

No obstant això, per a l'aplicació dels esmentats resultats a la pràctica clínica es requereix un nombre considerable d'estudis que abordin les limitacions dels anteriors dissenys i proporcionin dades consistents. En aquest sentit, resulta indispensable l'obtenció de mostres més àmplies a través de consorcis formats per diferents equips d'investigació (Froehlich et al., 2010; Gallo i Posner, 2016). L'establiment d'aquest tipus de col·laboracions, tanmateix, comporta el risc d'incrementar l'heterogeneïtat genètica i fenotípica (Akutagava-Martins et al., 2013; Franke et al., 2012; McGough, 2005; Rovaris et al., 2014), motiu pel qual convé seleccionar grups ètnicament homogenis i estandarditzar els protocols metodològics referits als criteris d'inclusió/exclusió, el fenotip d'estudi i els instruments d'avaluació (Gao, Liu, Qian i Wang, 2014; Masellis et al., 2002). Pel que fa als estudis farmacogenètics, nombrosos autors assenyalen la conveniència d'utilitzar assajos prospectius, aleatoritzats i controlats amb placebo que avaluïn un ampli ventall de dosis terapèutiques i diferents medicacions, tant psicoestimulants com no psicoestimulants, en múltiples períodes de temps (Bruxel et al., 2014; Froehlich et al., 2010; McGough, 2005; Stein i McGough, 2008). D'altres, en canvi, alerten de la dificultat de traslladar els resultats obtinguts a la pràctica assistencial, atès que les estrictes condicions en què es porten a terme es troben molt allunyades de la realitat clínica (Mas et al., 2012).

Un altre factor crític que convindrà consensuar, especialment en el marc de projectes col·laboratius, és la definició del fenotip d'estudi. Amb l'objectiu de reduir l'heterogeneïtat i d'augmentar el poder estadístic, cada vegada més professionals s'oposen a la tradicional concepció del TDAH com a constructe unitari i advoquen per aproximacions dimensionals al trastorn mitjançant la mesura quantitativa dels símptomes o l'ús d'endofenotips

(Akutagava-Martins et al., 2013; Gallo i Posner, 2016; Hawi et al., 2015). Els endofenotips, en concret, són caràcters hereditaris i mesurables, que es troben associats a un fenotip clínic determinat. A diferència dels diagnòstics categòrics, se'ls considera més propers als processos biològics que condueixen al trastorn i genèticament menys complexos, motiu pel qual resulten especialment apropiats per a l'estudi dels trastorns psiquiàtrics (Bruxel et al., 2014; Franke et al., 2012; Gallo i Posner, 2016; Hawi et al., 2015). Diversos trets neurocognitius, com la variabilitat en el temps de resposta, el control inhibitori o la memòria de treball, representen endofenotips prometedors per al TDAH, si es té en compte que les característiques principals del trastorn, entre elles la manca d'atenció i la hiperactivitat, es troben conceptualment relacionades amb dominis cognitius com les funcions executives (Franke et al., 2012; Gallo i Posner, 2016; Hawi et al., 2015). Tanmateix, aquest tipus d'endofenotips són susceptibles de generar errors en la mesura produïts per canvis en l'estat mental, la motivació, l'estrès o la fatiga i, per tant, no suposen un veritable avantatge respecte al fenotípic clínic (Kendler i Neale, 2010). Com a alternativa, s'han proposat les mesures electrofisiològiques i de neuroimatge estructural i funcional, malgrat compartir amb els trets cognitius la manca d'especificitat (Franke et al., 2012; Gallo i Posner, 2016; Kendler i Neale, 2010). Finalment, l'obtenció de mostres suficientment grans permetrà estratificar el trastorn en funció dels diferents subtipus o presentacions clíniques, en comptes de considerar el diagnòstic de TDAH globalment, fet que contribuirà també a disminuir l'heterogeneïtat genètica (Hawi et al., 2015). En el cas dels estudis farmacogenètics, a més d'estandarditzar els procediments d'avaluació de l'eficàcia i de promoure la utilització de mesures quantitatives, convindrà accentuar la necessitat de valorar la millora dels dèficits funcionals, així com l'aparició d'efectes adversos a la medicació (Bruxel et al., 2014; Froehlich et al., 2010).

Per altra banda, l'augment de la mida de la mostra hauria d'impulsar l'anàlisi en profunditat de les interaccions $\text{gen} \times \text{gen}$ i $\text{G} \times \text{E}$ (Akutagava-Martins et al., 2013; Asherson i Gurling, 2012; Bruxel et al., 2014; Contini et al., 2013), responsables en part de 'l'heretabilitat perduda' del TDAH i de l'absència de resultats consistents. En aquest sentit, es recomana complementar la recerca futura amb l'estudi dels mecanismes epigenètics (p. e., metilació de l'ADN, modificació de les histones o microARN) a través dels quals els factors ambientals indueixen canvis en l'expressió gènica a fi d'establir els processos implicats en l'aparició i progressió del trastorn o en la variabilitat de la resposta clínic. Malgrat que els dissenys longitudinals en humans resulten especialment apropiats per a aquests propòsits,

les dificultats metodològiques que comporten suggereixen l'ús de models animals, en què tant la càrrega genètica com l'ambiental pot ser manipulada experimentalment (Gao et al., 2014; Pennington et al., 2009).

Pel que fa als estudis farmacogenètics, confiem que les col·laboracions entre grups permetran, en un futur, la realització de GWAS que contribueixin a identificar nous candidats i vies biològiques subjacents als efectes farmacològics (Bruxel et al., 2014; Rovaris et al., 2014), d'acord amb la tendència observada en les investigacions sobre l'etiologia del TDAH. No obstant això, mentre no s'assoleixi la mida mostral necessària per obtenir senyals significatius a escala genòmica, convindrà millorar els estudis d'associació de gens candidats mitjançant diferents estratègies com ampliar els sistemes considerats fins ara. Així, per exemple, seria interessant avaluar els gens implicats en els processos de la farmacocinètica del MPH, entre ells, el metabolisme o el pas a través de membranes (Contini et al., 2013; Froehlich et al., 2010; McGough, 2005). Els gens dels sistema glutamatèrgic o del neurodesenvolupament també representen candidats prometedors (Bruxel et al., 2014), especialment tenint en compte els resultats de l'anterior GWAS sobre l'eficàcia i l'anàlisi de l'actual tesi doctoral (Mick et al., 2008). Finalment, caldrà que la recerca del futur es centri en caracteritzar la importància funcional de les variants identificades i els mecanismes a través dels quals influeixen els efectes terapèutics (Hawi et al., 2015), a més de replicar els resultats obtinguts en mostres independents suficientment grans.

Conclusions

1. Conclusions finals

- 1.1. Conclusions
- 1.2. Conclusions (English)

1. CONCLUSIONS FINALS

1.1. Conclusions

1. La variabilitat genètica en el receptor dopaminèrgic D4 confereix susceptibilitat al TDAH. Concretament, la variant L de la duplicació en tàndem de 120 pb i l'al·lel 7R del VNTR de 48 pb s'associen a la persistència del trastorn a l'edat adulta.
2. L'exposició a esdeveniments vitals adversos durant la infantesa, entre ells, l'abús sexual, físic o emocional, la violència domèstica, l'estrès familiar intens o les dificultats econòmiques, incrementa significativament la gravetat del trastorn a l'adulthood.
3. Els genotips de *DRD4* regulen la influència de les experiències estressants sobre la gravetat del TDAH atès que els individus portadors de la combinació al·lèlica L-7R sotmesos a esdeveniments vitals adversos puntuen significativament més baix en els símptomes d'inatenció.
4. Els polimorfismes en gens del sistema dopaminèrgic condicionen els efectes del tractament farmacològic per al TDAH en pacients pediàtrics amb el trastorn. En particular, la variació genètica a *DRD3*, *DBH* i *TH* està relacionada amb la resposta clínica al MPH mentre que els gens *DRD2* i *DBH* s'associen al risc d'aparició d'efectes adversos.
5. El consum de tabac per part de la mare durant l'embaràs disminueix la resposta terapèutica al MPH de la descendència.
6. Els individus portadors de variants genètiques de risc a *DRD3*, *DBH* o *TH* i amb mares fumadores durant l'embaràs presenten una major resistència al tractament farmacològic que els exposats únicament a factors de risc genètics o a nicotina dins l'úter.
7. L'anàlisi de variants genètiques a escala genòmica, complementada a través d'evidències biològiques i bioinformàtiques, ha permès relacionar la resposta al MPH amb gens implicats en el desenvolupament i funció del sistema nerviós, especialment en regions del cervell fonamentals per al control dels moviments, l'atenció i la memòria.

1.2. Conclusions (English)

1. Genetic variation in dopamine receptor D4 confers susceptibility to ADHD. Specifically, the L variant of a 120-bp duplication and the 7R allele of a 48-bp VNTR are associated with the disorder's persistence across the lifespan.
2. Exposure to adverse life events during childhood, such as sexual, physical or emotional abuse, domestic violence, extreme family stress or financial stress, significantly increases ADHD severity in adulthood.
3. *DRD4* genotypes modulate the influence of stressful experiences on ADHD severity, since subjects carrying the L-7R haplotype who experienced adverse life events have lower scores in inattentive symptoms than non-carriers.
4. Genetic polymorphisms in the dopamine neurotransmitter system determine the effects of pharmacological treatment in ADHD pediatric patients. In particular, MPH response is related to variation in *DRD3*, *DBH* and *TH*, while *DRD2* and *DBH* are associated with the emergence of adverse events to medication.
5. Maternal smoking during pregnancy decreases therapeutic response to MPH in the offspring.
6. Individuals carrying risk variants in *DRD3*, *DBH* or *TH*, whose mother smoked during pregnancy, show a poorer treatment response than those who have only been exposed to genetic factors or to nicotine in utero.
7. Genome-wide analysis of genetic variants, in combination with bioinformatic and biological evidence, relates MPH response to genes involved in nervous system development and function, especially in brain regions important for motor control, attention and memory.

Bibliografia

- 1000 Genomes Project Consortium, Auton, A., Brooks, L. D., Durbin, R. M., Garrison, E. P., Kang, H. M., ... Abecasis, G. R. (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature*, 526 (7571), 68-74.
- Aagaard, L. i Hansen, E. H. (2011). The occurrence of adverse drug reactions reported for attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) medications in the pediatric population: a qualitative review of empirical studies. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 7, 729-744.
- Aarnoudse-Moens, C. S., Weisglas-Kuperus, N., van Goudoever, J. B. i Oosterlaan, J. (2009). Meta-analysis of neurobehavioral outcomes in very preterm and/or very low birth weight children. *Pediatrics*, 124 (2), 717-728.
- Adamo, N., Seth, S. i Coghill, D. (2015). Pharmacological treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder: assessing outcomes. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 8 (4), 383-397.
- Adriani, W., Leo, D., Guarino, M., Natoli, A., Di Consiglio, E., De Angelis, G., ... Laviola, G. (2006). Short-term effects of adolescent methylphenidate exposure on brain striatal gene expression and sexual/endocrine parameters in male rats. *Ann N Y Acad Sci*, 1074, 52-73.
- Akutagava-Martins, G. C., Salatino-Oliveira, A., Kieling, C. C., Rohde, L. A. i Hutz, M. H. (2013). Genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: current findings and future directions. *Expert Rev Neurother*, 13 (4), 435-445.
- Albayrak, O., Friedel, S., Schimmelmann, B. G., Hinney, A. i Hebebrand, J. (2008). Genetic aspects in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Neural Transm (Vienna)*, 115 (2), 305-315.
- Aleman, S., Ribasés, M., Vilor-Tejedor, N., Bustamante, M., Sánchez-Mora, C., Bosch, R., ... Sunyer, J. (2015). New suggestive genetic loci and biological pathways for attention function in adult attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 168 (6), 459-470.
- Altink, M. E., Arias-Vásquez, A., Franke, B., Slaats-Willemse, D. I., Buschgens, C. J., Rommelse, N. N., ... Buitelaar, J. K. (2008). The dopamine receptor D4 7-repeat allele and prenatal smoking in ADHD-affected children and their unaffected siblings: no gene-environment interaction. *J Child Psychol Psychiatry*, 49 (10), 1053-1060.
- Altman, J. (1987). Morphological and behavioral markers of environmentally induced retardation of brain development: an animal model. *Environ Health Perspect*, 74, 153-168.

- American Psychiatric Association. (2000). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (4a ed. – text revisat). Washington, DC: American Psychiatric Association.
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (5a ed.). Washington, DC: American Psychiatric Association.
- Andrews, G. D. i Lavin, A. (2006). Methylphenidate increases cortical excitability via activation of alpha-2 noradrenergic receptors. *Neuropsychopharmacology*, *31* (3), 594-601.
- Angyal, N., Horvath, E. Z., Tarnok, Z., Richman, M. J., Bogнар, E., Lakatos, K., ... Nemoda, Z. (2018). Association analysis of norepinephrine transporter polymorphisms and methylphenidate response in ADHD patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *84* (Pt A), 122-128.
- Archer, T., Danysz, W., Fredriksson, A., Jonsson, G., Luthman, J., Sundström, E. i Teiling, A. (1988). Neonatal 6-hydroxydopamine-induced dopamine depletions: motor activity and performance in maze learning. *Pharmacol Biochem Behav*, *31* (2), 357-364.
- Arcos-Burgos, M., Castellanos, F. X., Pineda, D., Lopera, F., Palacio, J. D., Palacio, L. G., ... Muenke, M. (2004). Attention-deficit/hyperactivity disorder in a population isolate: linkage to loci at 4q13.2, 5q33.3, 11q22, and 17p11. *Am J Hum Genet*, *75* (6), 998-1014.
- Arcos-Burgos, M., Jain, M., Acosta, M. T., Shively, S., Stanescu, H., Wallis, D., ... Muenke, M. (2010). A common variant of the latrophilin 3 gene, LPHN3, confers susceptibility to ADHD and predicts effectiveness of stimulant medication. *Mol Psychiatry*, *15* (11), 1053-1066.
- Arias-Vásquez, A., Altink, M. E., Rommelse, N. N., Slaats-Willemse, D. I., Buschgens, C. J., Fliers, E. A., ... Buitelaar, J. K. (2011). CDH13 is associated with working memory performance in attention deficit/hyperactivity disorder. *Genes Brain Behav*, *10* (8), 844-851.
- Arns, M., de Ridder, S., Strehl, U., Breteler, M. i Coenen, A. (2009). Efficacy of neurofeedback treatment in ADHD: the effects on inattention, impulsivity and hyperactivity: a meta-analysis. *Clin EEG Neurosci*, *40* (3), 180-189.
- Arnsten, A. F. (2007). Catecholamine and second messenger influences on prefrontal cortical networks of “representational knowledge”: a rational bridge between genetics and the symptoms of mental illness. *Cereb Cortex*, *17* (Suppl 1), i6-15.

- Arnsten, A. F. (2011). Catecholamine influences on dorsolateral prefrontal cortical networks. *Biol Psychiatry*, *69* (12), e89-99.
- Arnsten, A. F. i Dudley, A. G. (2005). Methylphenidate improves prefrontal cortical cognitive function through alpha2 adrenoreceptor and dopamine D1 receptor actions: Relevance to therapeutic effects in Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Behav Brain Funct*, *1* (1), 2.
- Arnsten, A. F. i Pliszka, S. R. (2011). Catecholamine influences on prefrontal cortical function: relevance to treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder and related disorders. *Pharmacol Biochem Behav*, *99* (2), 211-216.
- Asghari, V., Sanyal, S., Buchwaldt, S., Paterson, A., Jovanovic, V. i Van Tol, H. H. (1995). Modulation of intracellular cyclic AMP levels by different human dopamine D4 receptor variants. *J Neurochem*, *65* (3), 1157-1165.
- Asherson, P. i Gurling, H. (2012). Quantitative and molecular genetics of ADHD. *Curr Top Behav Neurosci*, *9*, 239-272.
- Atkinson, M. i Hollis, C. (2010). NICE guideline: attention deficit hyperactivity disorder. *Arch Dis Child Educ Pract Ed*, *95* (1), 24-27.
- Bahena-Trujillo, R., Flores, G. i Arias-Montaña, J. A. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Rev Biomed*, *11*, 39-60.
- Bakermans-Kranenburg, M. J. i van Ijzendoorn, M. H. (2006). Gene-environment interaction of the dopamine D4 receptor (DRD4) and observed maternal insensitivity predicting externalizing behavior in preschoolers. *Dev Psychobiol*, *48* (5), 406-409.
- Bakermans-Kranenburg, M. J., van Ijzendoorn, M. H., Pijlman, F. T., Mesman, J. i Juffer, F. (2008). Experimental evidence for differential susceptibility: dopamine D4 receptor polymorphism (DRD4 VNTR) moderates intervention effects on toddlers' externalizing behavior in a randomized controlled trial. *Dev Psychol*, *44* (1), 293-300.
- Balding, D. J. (2006). A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet*, *7* (10), 781-791.
- Banaschewski, T., Becker, K., Scherag, S., Franke, B. i Coghill, D. (2010). Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: an overview. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, *19* (3), 237-257.
- Banaschewski, T., Coghill, D., Santosh, P., Zuddas, A., Asherson, P., Buitelaar, J., ... Taylor, E. (2006). Long-acting medications for the hyperkinetic disorders. A systematic review and European treatment guideline. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, *15* (8), 476-495.

- Banerjee, T. D., Middleton, F. i Faraone, S. V. (2007). Environmental risk factors for attention-deficit hyperactivity disorder. *Acta Paediatr*, 96 (9), 1269-1274.
- Barkley, R. A., McMurray, M. B., Edelbrock, C. S. i Robbins, K. (1990). Side effects of methylphenidate in children with attention deficit hyperactivity disorder: a systemic, placebo-controlled evaluation. *Pediatrics*, 86 (2), 184-192.
- Beach, S. R., Brody, G. H., Lei, M. K. i Philibert, R. A. (2010). Differential susceptibility to parenting among African American youths: testing the DRD4 hypothesis. *J Fam Psychol*, 24 (5), 513-521.
- Becker, K., El-Faddagh, M., Schmidt, M. H., Esser, G. i Laucht, M. (2008). Interaction of dopamine transporter genotype with prenatal smoke exposure on ADHD symptoms. *J Pediatr*, 152 (2), 263-269.
- Bernert, G., Hoeger, H., Mosgoeller, W., Stolzlechner, D. i Lubec, B. (2003). Neurodegeneration, neuronal loss, and neurotransmitter changes in the adult guinea pig with perinatal asphyxia. *Pediatr Res*, 54 (4), 523-528.
- Biederman, J. (2005). Attention-deficit/hyperactivity disorder: a selective overview. *Biol Psychiatry*, 57 (11), 1215-1220.
- Biederman, J. i Faraone, S. V. (2004). The Massachusetts General Hospital studies of gender influences on attention-deficit/hyperactivity disorder in youth and relatives. *Psychiatr Clin North Am*, 27 (2), 225-232.
- Biederman, J. i Faraone, S. V. (2005). Attention-deficit/hyperactivity disorder. *Lancet*, 366 (9481), 237-248.
- Biederman, J., Faraone, S. V., Keenan, K., Benjamin, J., Krifcher, B., Moore, C., ... Tsuang, M. T. (1992). Further evidence for family-genetic risk factors in attention deficit hyperactivity disorder. Patterns of comorbidity in probands and relatives psychiatrically and pediatrically referred samples. *Arch Gen Psychiatry*, 49 (9), 728-738.
- Biederman, J., Faraone, S. V., Keenan, K., Knee, D., Tsuang, M. T. (1990). Family-genetic and psychosocial risk factors in DSM-III attention deficit disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 29 (4), 526-533.
- Biederman, J., Faraone, S. V., Mick, E., Spencer, T., Wilens, T., Kiely, K., ... Warburton, R. (1995). High risk for attention deficit hyperactivity disorder among children of parents with childhood onset of the disorder: a pilot study. *Am J Psychiatry*, 152 (3), 431-435.

- Biederman, J., Melmed, R. D., Patel, A., McBurnett, K., Donahue, J. i Lyne, A. (2008). Long-term, open-label extension study of guanfacine extended release in children and adolescents with ADHD. *CNS Spectr*, *13* (12), 1047-1055.
- Blood-Siegfried, J. i Rende, E. K. (2010). The long-term effects of prenatal nicotine exposure on neurologic development. *J Midwifery Womens Health*, *55* (2), 143-152.
- Bolea-Alamañac, B., Nutt, D. J., Adamou, M., Asherson, P., Bazire, S., Coghill, D., ... British Association for Psychopharmacology. (2014). Evidence-based guidelines for the pharmacological management of attention deficit hyperactivity disorder: update on recommendations from the British Association for Psychopharmacology. *J Psychopharmacol*, *28* (3), 179-203.
- Brandon, C. L. i Steiner, H. (2003). Repeated methylphenidate treatment in adolescent rats alters gene regulation in the striatum. *Eur J Neurosci*, *18* (6), 1584-1592.
- Brevik, E. J., van Donkelaar, M. M., Weber, H., Sánchez-Mora, C., Jacob, C., Rivero, O., ... Zayats, T. (2016). Genome-wide analyses of aggressiveness in attention-deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, *171* (5), 733-747.
- Brookes, K. J., Mill, J., Guindalini, C., Curran, S., Xu, X., Knight, J., ... Asherson, P. (2006). A common haplotype of the dopamine transporter gene associated with attention-deficit/hyperactivity disorder and interacting with maternal use of alcohol during pregnancy. *Arch Gen Psychiatry*, *63* (1), 74-81.
- Brusco, N. K. i Watts, J. J. (2015). Empirical evidence of recall bias for primary health care visits. *BMC Health Serv Res*, *15*, 381.
- Bruxel, E. M., Akutagava-Martins, G. C., Salatino-Oliveira, A., Contini, V., Kieling, C., Hutz, M. H. i Rohde, L. A. (2014). ADHD pharmacogenetics across the life cycle: New findings and perspectives. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, *165B* (4), 263-282.
- Bruxel, E. M., Salatino-Oliveira, A., Akutagava-Martins, G. C., Tovo-Rodrigues, L., Genro, J. P., Zeni, C. P., ... Hutz, M. H. (2015). LPHN3 and attention-deficit/hyperactivity disorder: a susceptibility and pharmacogenetic study. *Genes Brain Behav*, *14* (5), 419-427.
- Bruxel, E. M., Salatino-Oliveira, A., Genro, J. P., Zeni, C. P., Polanczyk, G. V., Chazan, R., ... Hutz, M. H. (2013). Association of a carboxylesterase 1 polymorphism with appetite reduction in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder treated with methylphenidate. *Pharmacogenomics J*, *13* (5), 476-480.

- Bublitz, M. H. i Stroud, L. R. (2012). Maternal smoking during pregnancy and offspring brain structure and function: review and agenda for future research. *Nicotine Tob Res*, 14 (4), 388-397.
- Buchmann, A. F., Zohsel, K., Blomeyer, D., Hohm, E., Hohmann, S., Jennen-Steinmetz, C., ... Laucht, M. (2014). Interaction between prenatal stress and dopamine D4 receptor genotype in predicting aggression and cortisol levels in young adults. *Psychopharmacology (Berl)*, 231 (16), 3089-3097.
- Button, T. M., Maughan, B. i McGuffin, P. (2007). The relationship of maternal smoking to psychological problems in the offspring. *Early Hum Dev*, 83 (11), 727-732.
- Button, T. M., Thapar, A. i McGuffin, P. (2005). Relationship between antisocial behaviour, attention-deficit hyperactivity disorder and maternal prenatal smoking. *Br J Psychiatry*, 187, 155-160.
- Caldji, C., Tannenbaum, B., Sharma, S., Francis, D., Plotsky, P. M. i Meaney, M. J. (1998). Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (9), 5335-5340.
- Cantwell, D. P. (1975). Genetic studies of hyperactive children: psychiatric illness in biologic and adopting parents. *Proc Annu Meet Am Psychopathol Assoc*, (63), 273-280.
- Caspi, A., McClay, J., Moffitt, T. E., Mill, J., Martin, J., Craig, I. W., ... Poulton, R. (2002). Role of genotype in the cycle of violence in maltreated children. *Science*, 297 (5582), 851-854.
- Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T. E., Taylor, A., Craig, I. W., Harrington, H., ... Poulton, R. (2003). Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*, 301 (5631), 386-389.
- Castellanos, F. X. i Acosta, M. T. (2011). Towards an understanding of the molecular mechanisms underlying the pharmacological treatments of attention deficit hyperactivity disorder. *Rev Neurol*, 52 (Suppl 1), S155-160.
- Castellanos, F. X., Lee, P. P., Sharp, W., Jeffries, N. O., Greenstein, D. K., Clasen, L. S., ... Rapoport, J. L. (2002). Developmental trajectories of brain volume abnormalities in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *JAMA*, 288 (14), 1740-1748.
- Catalá-López, F., Peiró, S., Ridao, M., Sanfèlix-Gimeno, G., Gènova-Maleras, R. i Catalá, M. A. (2012). Prevalence of attention deficit hyperactivity disorder among children and adolescents in Spain: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *BMC Psychiatry*, 12, 168.

- Chang, F. M., Kidd, J. R., Livak, K. J., Pakstis, A. J. i Kidd, K. K. (1996). The world-wide distribution of allele frequencies at the human dopamine D4 receptor locus. *Hum Genet*, 98 (1), 91-101.
- Chang, L., Cloak, C. C., Jiang, C. S., Hoo, A., Hernandez, A. B. i Ernst, T. M. (2012). Lower glial metabolite levels in brains of young children with prenatal nicotine exposure. *J Neuroimmune Pharmacol*, 7 (1), 243-252.
- Chase, T. D., Brown, R. E., Carrey, N. i Wilkinson, M. (2003). Daily methylphenidate administration attenuates c-fos expression in the striatum of prepubertal rats. *Neuroreport*, 14 (5), 769-772.
- Chase, T. D., Carrey, N., Brown, R. E. i Wilkinson, M. (2005). Methylphenidate regulates c-fos and fosB expression in multiple regions of the immature rat brain. *Brain Res Dev Brain Res*, 156 (1), 1-12.
- Cheon, K. A., Cho, D. Y., Koo, M. S., Song, D. H. i Namkoong, K. (2009). Association between homozygosity of a G allele of the alpha-2a-adrenergic receptor gene and methylphenidate response in Korean children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*, 65 (7), 564-570.
- Cheon, K. A., Jun, J. Y. i Cho, D. Y. (2008). Association of the catechol-O-methyltransferase polymorphism with methylphenidate response in a classroom setting in children with attention-deficit hyperactivity disorder. *Int Clin Psychopharmacol*, 23 (5), 291-298.
- Cheon, K. A., Kim, B. N. i Cho, S. C. (2007). Association of 4-repeat allele of the dopamine D4 receptor gene exon III polymorphism and response to methylphenidate treatment in Korean ADHD children. *Neuropsychopharmacology*, 32 (6), 1377-1383.
- Cheon, K. A., Ryu, Y. H., Kim, J. W. i Cho, D. Y. (2005). The homozygosity for 10-repeat allele at dopamine transporter gene and dopamine transporter density in Korean children with attention deficit hyperactivity disorder: relating to treatment response to methylphenidate. *Eur Neuropsychopharmacol*, 15 (1), 95-101.
- Cho, S. C., Kim, B. N., Cummins, T. D., Kim, J. W. i Bellgrove, M. A. (2012). Norepinephrine transporter -3081(A/T) and alpha-2A-adrenergic receptor MspI polymorphisms are associated with cardiovascular side effects of OROS-methylphenidate treatment. *J Psychopharmacol*, 26 (3), 380-389.
- Choudhry, Z., Sengupta, S. M., Grizenko, N., Fortier, M. E., Thakur, G. A., Bellingham, J. i Joobar, R. (2012). LPHN3 and attention-deficit/hyperactivity disorder: interaction with maternal stress during pregnancy. *J Child Psychol Psychiatry*, 53 (8), 892-902.

- Chronister, R. B., Palmer, G. C. i Gerbrandt, L. (1980). Alteration in adenylate cyclase response to aminergic stimulation following neonatal x-irradiation. *Brain Res Bull*, 5 (6), 649-651.
- Coghill, D. i Banaschewski, T. (2009). The genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Expert Rev Neurother*, 9 (10), 1547-1565.
- Coghill, D. i Seth, S. (2015). Effective management of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) through structured re-assessment: the Dundee ADHD Clinical Care Pathway. *Child Adolesc Psychiatry Ment Health*, 9, 52.
- Cohen, G., Roux, J. C., Grailhe, R., Malcolm, G., Changeaux, J. P. i Lagercrantz, H. (2005). Perinatal exposure to nicotine causes deficits associated with a loss of nicotinic receptor function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (10), 3817-3821.
- Contini, V., Rovaris, D. L., Victor, M. M., Grevet, E. H., Rohde, L. A. i Bau, C. H. (2013). Pharmacogenetics of response to methylphenidate in adult patients with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD): a systematic review. *Eur Neuropsychopharmacol*, 23 (6), 555-560.
- Contini, V., Victor, M. M., Bertuzzi, G. P., Salgado, C. A., Picon, F. A., Grevet, E. H., ... Bau, C. H. (2012). No significant association between genetic variants in 7 candidate genes and response to methylphenidate treatment in adult patients with ADHD. *J Clin Psychopharmacol*, 32 (6), 820-823.
- Contini, V., Victor, M. M., Cerqueira, C. C., Polina, E. R., Grevet, E. H., Salgado, C. A., ... Bau, C. H. (2011). Adrenergic $\alpha 2A$ receptor gene is not associated with methylphenidate response in adults with ADHD. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 261 (3), 205-211.
- Contini, V., Victor, M. M., Marques, F. Z., Bertuzzi, G. P., Salgado, C. A., Silva, K. L., ... Bau, C. H. (2010). Response to methylphenidate is not influenced by DAT1 polymorphisms in a sample of Brazilian adult patients with ADHD. *J Neural Transm (Vienna)*, 117 (2), 269-276.
- Cook, E. H. Jr., Stein, M. A., Krasowski, M. D., Cox, N. J., Olkon, N. J., Kieffer, J. E., Leventhal, B. L. (1995). Association of attention-deficit disorder and the dopamine transporter gene. *Am J Hum Genet*, 56 (4), 993-998.
- Cortese, S. (2012). The neurobiology and genetics of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD): what every clinician should know. *Eur J Paediatr Neurol*, 16 (5), 422-433.

- Cortese, S., Ferrin, M., Brandeis, D., Buitelaar, J., Daley, D., Dittmann, R. W., ... European ADHD Guidelines Group (EAGG). (2015). Cognitive training for attention-deficit/hyperactivity disorder: meta-analysis of clinical and neuropsychological outcomes from randomized controlled trials. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 54 (3), 164-174.
- Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Lee, S. H., Ripke, S., Neale, B. M., Faraone, S. V., Purcell, S. M., ... International Inflammatory Bowel Disease Genetics Consortium (IBDGC). (2013). Genetic relationship between five psychiatric disorders estimated from genome-wide SNPs. *Nat Genet*, 45 (9), 984-994.
- D'Onofrio, B. M., Van Hulle, C. A., Waldman, I. D., Rodgers, J. L., Harden, K. P., Rathouz, P. J. i Lahey, B. B. (2008). Smoking during pregnancy and offspring externalizing problems: an exploration of genetic and environmental confounds. *Dev Psychopathol*, 20 (1), 139-164.
- da Silva, B. S., Cupertino, R. B., Rovaris, D. L., Schuch, J. B., Kappel, D. B, Müller, D., ... Bau, C. H. D. (2017). Exocytosis-related genes and response to methylphenidate treatment in adults with ADHD. *Mol Psychiatry*. E-pub ahead of print May 2. doi: 10.1038/mp.2017.90.
- da Silva, T. L., Pianca, T. G., Roman, T., Hutz, M. H., Faraone, S. V., Schmitz, M. i Rohde, L. A. (2008). Adrenergic alpha2A receptor gene and response to methylphenidate in attention-deficit/hyperactivity disorder-predominantly inattentive type. *J Neural Transm (Vienna)*, 115 (2), 341-345.
- Daley, D., van der Oord, S., Ferrin, M., Danckaerts, M., Doepfner, M., Cortese, S., ... European ADHD Guidelines Group. (2014). Behavioral interventions in attention-deficit/hyperactivity disorder: a meta-analysis of randomized controlled trials across multiple outcome domains. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 53 (8), 835-847.
- Dalsgaard, S., Kvist, A. P., Leckman, J. F., Nielsen, H. S. i Simonsen, M. (2014). Cardiovascular safety of stimulants in children with attention-deficit/hyperactivity disorder: a nationwide prospective cohort study. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, 24 (6), 302-310.
- Davies, W. (2014). Sex differences in attention Deficit Hyperactivity Disorder: candidate genetic and endocrine mechanisms. *Front Neuroendocrinol*, 35 (3), 331-346.
- Dawn Teare, M. i Barrett, J. H. (2005). Genetic linkage studies. *Lancet*, 366 (9490), 1036-1044.

- Demontis, D., Walters, R. K., Martin, J., Mattheisen, M., Als, T. D., Agerbo, E., ... Neale, B. M. (2018). Discovery of the first genome-wide significant risk loci for ADHD. *Nat Genet.* [En premsa].
- De Sanctis, V. A., Nomura, Y., Newcorn, J. H. i Halperin, J. M. (2012). Childhood maltreatment and conduct disorder: independent predictors of criminal outcomes in ADHD youth. *Child Abuse Negl*, 36 (11-12), 782-789.
- Dilalla, L. F., Gheyara, S. i Bersted, K. (2013). The Southern Illinois Twins and Siblings Study (SITSS): description and update. *Twin Res Hum Genet*, 16 (1), 371-375.
- Drgon, T., Montoya, I., Johnson, C., Liu, Q. R., Walther, D., Hamer, D. i Uhl, G. R. (2009). Genome-wide association for nicotine dependence and smoking cessation success in NIH research volunteers. *Mol Med*, 15 (1-2), 21-27.
- Duman, R. S. (2002). Synaptic plasticity and mood disorders. *Mol Psychiatry*, 7 (Suppl 1), S29-34.
- Durston, S. (2003). A review of the biological bases of ADHD: what have we learned from imaging studies? *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 9 (3), 184-195.
- Ebejer, J. L., Duffy, D. L., van der Werf, J., Wright, M. J., Montgomery, G., Gillespie, N. A., ... Medland, S. E. (2013). Genome-wide association study of inattention and hyperactivity-impulsivity measured as quantitative traits. *Twin Res Hum Genet*, 16 (2), 560-574.
- El Marroun, H., Schmidt, M. N., Franken, I. H., Jaddoe, V. W., Hofman, A., van der Lugt, A., ... White, T. (2014). Prenatal tobacco exposure and brain morphology: a prospective study in young children. *Neuropsychopharmacology*, 39 (4), 792-800.
- Elia, J., Ambrosini, P. i Berrettini, W. (2008). ADHD characteristics: I. Concurrent comorbidity patterns in children & adolescents. *Child Adolesc Psychiatry Ment Health*, 2 (1), 15.
- Elia, J., Gai, X., Xie, H. M., Perin, J. C., Geiger, E., Glessner, J. T., ... White, P. S. (2010). Rare structural variants found in attention-deficit hyperactivity disorder are preferentially associated with neurodevelopmental genes. *Mol Psychiatry*, 15 (6), 637-646.
- Elia, J., Glessner, J. T., Wang, K., Takahashi, N., Shtir, C. J., Hadley, D., ... Hakonarson, H. (2011). Genome-wide copy number variation study associates metabotropic glutamate receptor gene networks with attention deficit hyperactivity disorder. *Nat Genet*, 44 (1), 78-84.

- Elia, J., Laracy, S., Allen, J., Nissley-Tsiopinis, J. i Borgmann-Winter, K. (2012). Epigenetics: genetics versus life experiences. *Curr Top Behav Neurosci*, 9, 317-340.
- Ellis, B. i Nigg, J. (2009). Parenting practices and attention-deficit/hyperactivity disorder: new findings suggest partial specificity of effects. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 48 (2), 146-154.
- Evangelou, E., Trikalinos, T. A., Salanti, G. i Ioannidis, J. P. (2006). Family-based versus unrelated case-control designs for genetic associations. *PLoS Genet*, 2 (8), e123.
- Faraone, S. V. i Antshel, K. M. (2014). Towards an evidence-based taxonomy of nonpharmacologic treatments for ADHD. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*, 23 (4), 965-972.
- Faraone, S. V., Asherson, P., Banaschewsky, T., Biederman, J., Buitelaar, J. K., Ramos-Quiroga, J. A., ... Franke, B. (2015). Attention-deficit/hyperactivity disorder. *Nat Rev Dis Primers*, 1, 15020.
- Faraone, S. V., Biederman, J. i Mick, E. (2006). The age-dependent decline of attention deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis of follow-up studies. *Psychol Med*, 36 (2), 159-165.
- Faraone, S. V., Biederman, J., Mick, E., Williamson, S., Wilens, T., Spencer, T., ... Zallen, B. (2000). Family study of girls with attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry*, 157 (7), 1077-1083.
- Faraone, S. V., Biederman, J., Morley, C. P. i Spencer, T. J. (2008). Effect of stimulants on height and weight: a review of the literature. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 47 (9), 994-1009.
- Faraone, S. V., Biederman, J., Spencer, T. J. i Aleardi, M. (2006). Comparing the efficacy of medications for ADHD using meta-analysis. *MedGenMed*, 8 (4), 4.
- Faraone, S. V., Bonvicini, C. i Scassellati, C. (2014). Biomarkers in the diagnosis of ADHD—promising directions. *Curr Psychiatry Rep*, 16 (11), 497.
- Faraone, S. V., Doyle, A. E., Mick, E. i Biederman, J. (2001). Meta-analysis of the association between the 7-repeat allele of the dopamine D(4) receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry*, 158 (7), 1052-1057.
- Faraone, S. V. i Glatt, S. J. (2010). A comparison of the efficacy of medications for adult attention-deficit/hyperactivity disorder using meta-analysis of effect sizes, *J Clin Psychiatry*, 71 (6), 754-763.

- Faraone, S. V., Perlis, R. H., Doyle, A. E., Smoller, J. W., Goralnick, J. J., Holmgren, M. A. i Sklar, P. (2005). Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*, 57 (11), 1313-1323.
- Fayyad, J., De Graaf, R., Kessler, R., Alonso, J., Angermeyer, M., Demyttenaere, K., ... Jin, R. (2007). Cross-national prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder. *Br J Psychiatry*, 190, 402-409.
- Feldman, H. M. i Reiff, M. I. (2014). Clinical practice. Attention deficit-hyperactivity disorder in children and adolescents. *N Engl J Med*, 370 (9), 838-846.
- Ferguson, S. A. (1996). Neuroanatomical and functional alterations resulting from early postnatal cerebellar insults in rodents. *Pharmacol Biochem Behav*, 55 (4), 663-671.
- Ferguson, S. A., Paule, M. G. i Holson, R. R. (1996). Functional effects of methylazoxymethanol-induced cerebellar hypoplasia in rats. *Neurotoxicol Teratol*, 18 (5), 529-537.
- Fernandes, B. S., Gama, C. S., Walz, J. C., Ceresér, K. M., Fries, G. R., Colpo, G., ... Kapczinski, F. (2010). Increased neurotrophin-3 in drug-free subjects with bipolar disorder during maniac and depressive episodes. *J Psychiatr Res*, 44 (9), 561-565.
- Fernández-Chacón, R., Königstorfer, A., Gerber, S. H., García, J., Matos, M. F., Stevens, C. F., ... Südhof, T. C. (2001). Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature*, 410 (6824), 41-49.
- Fleckenstein, A. E., Volz, T. J., Riddle, E. L., Gibb, J. W. i Hanson, G. R. (2007). New insights into the mechanism of action of amphetamines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47, 681-698.
- Fliers, E. A., Vasquez, A. A., Poelmans, G., Rommelse, N., Altink, M., Buschgens, C., ... Franke, B. (2012). Genome-wide association study of motor coordination problems in ADHD identifies genes for brain and muscle function. *World J Biol Psychiatry*, 13 (3), 211-222.
- Forero, D. A., Arboleda, G. H., Vasquez, R. i Arboleda, H. (2009). Candidate genes involved in neural plasticity and the risk for attention-deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis of 8 common variants. *J Psychiatry Neurosci*, 34 (5), 361-366.
- Francis, D., Diorio, J., Liu, D. i Meaney, M. J. (1999). Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science*, 286 (5442), 1155-1158.
- Franke, B., Faraone, S. V., Asherson, P., Buitelaar, J., Bau, C. H., Ramos-Quiroga, J. A., ... International Multicentre persistent ADHD CollaboraTion. (2012). The genetics of

- attention deficit/hyperactivity disorder in adults, a review. *Mol Psychiatry*, 17 (10), 960-987.
- Franke, B., Neale, B. M. i Faraone, S. V. (2009). Genome-wide association studies in ADHD. *Hum Genet*, 126 (1), 13-50.
- Freitag, C. M., Hänig, S., Schneider, A., Seitz, C., Palmason, H., Retz, W. i Meyer, J. (2012). Biological and psychosocial environmental risk factors influence symptom severity and psychiatric comorbidity in children with ADHD. *J Neural Transm (Vienna)*, 119 (1), 81-94.
- Froehlich, T. E., Epstein, J. N., Nick, T. G., Melguizo Castro, M. S., Stein, M. A., Brinkman, W. B., ... Kahn, R. S. (2011). Pharmacogenetic predictors of methylphenidate dose-response in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 50 (11), 1129-1139.e2.
- Froehlich, T. E., McGough, J. J. i Stein, M. A. (2010). Progress and promise of attention-deficit hyperactivity disorder pharmacogenetics. *CNS Drugs*, 24 (2), 99-117.
- Gainetdinov, R. R., Wetsel, W. C., Jones, S. R., Levin, E. D., Jaber, M. i Caron, M. G. (1999). Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity. *Science*, 283 (5400), 397-401.
- Gajria, K., Lu, M., Sikirica, V., Greven, P., Zhong, Y., Qin, P., Xie, J. (2014). Adherence, persistence, and medication discontinuation in patients with attention-deficit/hyperactivity disorder – a systematic literature review. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 10, 1543-1569.
- Gallo, E. F. i Posner, J. (2016). Moving towards causality in attention-deficit hyperactivity disorder: overview of neural and genetic mechanisms. *Lancet Psychiatry*, 3 (6), 555-567.
- Gao, Q., Liu, L., Qian, Q. i Wang, Y. (2014). Advances in molecular genetic studies of attention deficit hyperactivity disorder in China. *Shanghai Arch Psychiatry*, 26 (4), 194-206.
- Gazzara, R. A. i Altman, J. (1981). Early postnatal x-irradiation of the hippocampus and discrimination learning in adult rats. *J Comp Physiol Psychol*, 95 (3), 484-495.
- Gehricke, J. G., Loughlin, S. E., Whalen, C. K., Potkin, S. G., Fallon, J. H., Jamner, L. D., ... Leslie, F. M. (2007). Smoking to self-medicate attentional and emotional dysfunctions. *Nicotine Tob Res*, 9 (Suppl 4), S523-536.
- Genro, J. P., Kieling, C., Rohde, L. A. i Hutz, M. H. (2010). Attention-deficit/hyperactivity disorder and the dopaminergic hypotheses. *Expert Rev Neurother*, 10 (4), 587-601.

- Gizer, I. R., Ficks, C. i Waldman, I. D. (2009). Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet*, 126 (1), 51-90.
- Gomez-Sanchez, C. I., Carballo, J. J., Riveiro-Alvarez, R., Soto-Insuga, V., Rodrigo, M., Mahillo-Fernandez, I., ... Ayuso, C. (2017). Pharmacogenetics of methylphenidate in childhood attention-deficit/hyperactivity disorder: long-term effects. *Sci Rep*, 7 (1), 10391.
- Gonçalves, V. F., Zai, C. C., Tiwari, A. K., Brandl, E. J., Derkach, A., Meltzer, H. Y., ... Kennedy, J. L. (2014). A hypothesis-driven association study of 28 nuclear-encoded mitochondrial genes with antipsychotic-induced weight gain in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 39 (6), 1347-1354.
- Graham, J., Banaschewski, T., Buitelaar, J., Coghill, D., Danckaerts, M., Dittmann, R. W., ... European Guidelines Group. (2011). European guidelines on managing adverse effects of medication for ADHD. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 20 (1), 17-37.
- Greenhill, L. L., Findling, R. L., Swanson, J. M. i ADHD Study Group. (2002). A double-blind, placebo-controlled study of modified-release methylphenidate in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pediatrics*, 109 (3), E39.
- Greenhill, L. L., Pliszka, S., Dulcan, M. K., Bernet, W., Arnold, V., Beitchman, J., ... American Academy of Child and Adolescent Psychiatry. (2002). Practice parameter for the use of stimulant medications in the treatment of children, adolescents, and adults. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 41 (2 Suppl), 26S-49S.
- Greenhill, L. L., Vitiello, B., Riddle, M. A., Fisher, P., Shockey, E., March, J. S., ... Rosengarten, J. (2003). Review of safety assessment methods used in pediatric psychopharmacology. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 42 (6), 627-633.
- Grizenko, N., Shayan, Y. R., Polotskaia, A., Ter-Stepanian, M. i Joobar, R. (2008). Relation of maternal stress during pregnancy to symptom severity and response to treatment in children with ADHD. *J Psychiatry Neurosci*, 33 (1), 10-16.
- Gruber, R., Joobar, R., Grizenko, N., Leventhal, B. L., Cook, E. H. i Stein, M. A. (2009). Dopamine transporter genotype and stimulant side effect factors in youth diagnosed with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, 19 (3), 233-239.
- Gudsnuk, K. i Champagne, F. A. (2012). Epigenetic influence of stress and the social environment. *ILAR J*, 53 (3-4), 279-288.
- Guimarães, A. P., Zeni, C., Polanczyk, G., Genro, J. P., Roman, T., Rohde, L. A. i Hutz, M. H. (2009). MAOA is associated with methylphenidate improvement of oppositional

- symptoms in boys with attention deficit hyperactivity disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*, 12 (5), 709-714.
- Haavik, J., Halmøy, A., Lundervold, A. J. i Fasmer, O. B. (2010). Clinical assessment and diagnosis of adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Expert Rev Neurother*, 10 (10), 1569-1580.
- Hackman, D. A., Farah, M. J. i Meaney, M. J. (2010). Socioeconomic status and the brain: mechanistic insights from human and animal research. *Nat Rev Neurosci*, 11 (9), 651-659.
- Haghighi, A., Schwartz, D. H., Abrahamowicz, M., Leonard, G. T., Perron, M., Richer, L., ... Pausova, Z. (2013). Prenatal exposure to maternal cigarette smoking, amygdala volume, and fat intake in adolescence. *JAMA Psychiatry*, 70 (1), 98-105.
- Halperin, E. i Stephan, D. A. (2009). SNP imputation in association studies. *Nat Biotechnol*, 27 (4), 349-351.
- Hamarman, S., Fossella, J., Ulger, C., Brimacombe, M. i Dermody, J. (2004). Dopamine receptor 4 (DRD4) 7-repeat allele predicts methylphenidate dose response in children with attention deficit hyperactivity disorder: a pharmacogenetic study. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, 14 (4), 564-574.
- Hamza, M., Halayem, S., Bourgou, S., Daoud, M., Charfi, F. i Belhadj, A. (2017). Epigenetics and ADHD: Toward an Integrative Approach of the Disorder Pathogenesis. *J Atten Disord*. E-pub ahead of print Mar 1. doi: 10.1177/1087054717696769.
- Hassan, E. (2005). Recall Bias can be a Threat to Retrospective and Prospective Research Designs. *Internet J Epidemiol*, 3 (2), 1-11.
- Hawi, Z., Cummins, T. D., Tong, J., Johnson, B., Lau, R., Samarraï, W. i Bellgrove, M. A. (2015). The molecular genetic architecture of attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*, 20 (3), 289-297.
- Heal, D. J., Cheetham, S. C. i Smith, S. L. (2009). The neuropharmacology of ADHD drugs in vivo: insights on efficacy and safety. *Neuropharmacology*, 57 (7-8), 608-618.
- Heal, D. J., Smith, S. L., Gosden, J. i Nutt, D. J. (2013). Amphetamine, past and present—a pharmacological and clinical perspective. *J Psychopharmacol*, 27 (6), 479-496.
- Heckers, S. i Konradi, C. (2003). Synaptic function and biochemical neuroanatomy. A A. Martin, L. Scahill, D. S. Charney i J. F. Leckman (eds.), *Pediatric Psychopharmacology: Principles and Practice* (pp. 20-32). Oxford University Press: New York.

- Hegvik, T. A., Jacobsen, K. K., Fredriksen, M., Zayats, T. i Haavik, J. (2016). A candidate gene investigation of methylphenidate response in adult attention-deficit/hyperactivity disorder patients: results from a naturalistic study. *J Neural Transm (Vienna)*, 123 (8), 859-865.
- Heils, A., Teufel, A., Petri, S., Stöber, G., Riederer, P., Bengel, D. i Lesch, K. P. (1996). Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J Neurochem*, 66 (6), 2621-2624.
- Hess, E. J., Jinnah, H. A., Kozak, C. A. i Wilson, M. C. (1992). Spontaneous locomotor hyperactivity in a mouse mutant with a deletion including the Snap gene on chromosome 2. *J Neurosci*, 12 (7), 2865-2874.
- Highfield, D. A., Hu, D. i Amsel, A. (1998). Alleviation of x-irradiation-based deficit in memory-based learning by D-amphetamine: suggestions for attention deficit-hyperactivity disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (10), 5785-5788.
- Hinney, A., Scherag, A., Jarick, I., Albayrak, Ö., Pütter, C., Pechlivanis, S., ... Psychiatric GWAS Consortium: ADHD subgroup. (2011). Genome-wide association study in German patients with attention deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 156B (8), 888-897.
- Hock, C., Heese, K., Müller-Spahn, F., Huber, P., Riesen, W., Nitsch, R. M. i Otten, U. (2000). Increased cerebrospinal fluid levels of neurotrophin 3 (NT-3) in elderly patients with major depression. *Mol Psychiatry*, 5 (5), 510-513.
- Holbrook, B. D. (2016). The effects of nicotine on human fetal development. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 108 (2), 181-192.
- Holtmann, M., Sonuga-Barke, E., Cortese, S. i Brandeis, D. (2014). Neurofeedback for ADHD: a review of current evidence. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*, 23 (4), 789-806.
- Hong, S. B., Kim, J. W., Cho, S. C., Shin, M. S., Kim, B. N. i Yoo, H. J. (2012). Dopaminergic and noradrenergic gene polymorphisms and response to methylphenidate in Korean children with attention-deficit/hyperactivity disorder: is there an interaction? *J Child Adolesc Psychopharmacol*, 22 (5), 343-352.
- Hoogman, M., Bralten, J., Hibar, D. P., Mennes, M., Zwiers, M. P., Schweren, L. S. J., ... Franke, B. (2017). Subcortical brain volume differences in participants with attention deficit hyperactivity disorder in children and adults: a cross-sectional mega-analysis. *Lancet Psychiatry*, 4 (4), 310-319.

- Hu, X. Z., Lipsky, R. H., Zhu, G., Akhtar, L. A., Taubman, J., Greenberg, B. D., ... Goldman, D. (2006). Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. *Am J Hum Genet*, 78 (5), 815-826.
- Huang, H. C., Wu, L. S., Yu, S. C., Wu, B. J., Lua, A. C., Lee, S. M. i Liu, C. Z. (2018). The Alpha-2A Adrenergic Receptor Gene -1291C/G Single Nucleotide Polymorphism is Associated with the Efficacy of Methylphenidate in Treating Taiwanese Children and Adolescents with Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. *Psychiatry Investig*, 15 (3), 306-312.
- Hwang, R., Souza, R. P., Tiwari, A. K., Zai, C. C., Müller, D. J., Potkin, S. G., ... Kennedy, J. L. (2011). Gene-gene interaction analyses between NMDA receptor subunit and dopamine receptor gene variants and clozapine response. *Pharmacogenomics*, 12 (2), 277-291.
- Jaber, M., Robinson, S. W., Missale, C. i Caron, M. G. (1996). Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology*, 35 (11), 1503-1519.
- Jackson, D. M. i Westlind-Danielsson, A. (1994). Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol Ther*, 64 (2), 291-370.
- Jacobsen, L. K., Picciotto, M. R., Heath, C. J., Frost, S. J., Tsou, K. A., Dwan, R. A., ... Mencl, W. E. (2007). Prenatal and adolescent exposure to tobacco smoke modulates the development of white matter microstructure. *J Neurosci*, 27 (49), 13491-13498.
- Jain, M., Vélez, J. I., Acosta, M. T., Palacio, L. G., Balog, J., Roessler, E., ... Muenke, M. (2012). A cooperative interaction between LPHN3 and 11q doubles the risk for ADHD. *Mol Psychiatry*, 17 (7), 741-747.
- Jain, R., Segal, S., Kollins, S. H. i Khayrallah, M. (2011). Clonidine extended-release tablets for pediatric patients with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 50 (2), 171-179.
- Jarick, I., Volckmar, A. L., Pütter, C., Pechlivanis, S., Nguyen, T. T., Dauvermann, M. R., ... Hinney, A. (2014). Genome-wide analysis of rare copy number variations reveals PARK2 as a candidate gene for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*, 19 (1), 115-121.
- Jensen, C. M. i Steinhausen, H. C. (2015). Comorbid mental disorders in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder in a large nationwide study. *Atten Defic Hyperact Disord*, 7 (1), 27-38.
- Ji, H. S., Paik, K. C., Park, W. S. i Lim, M. H. (2013). No Association between the Response to Methylphenidate and DRD4 Gene Polymorphism in Korean Attention Deficit

- Hyperactivity Disorder: A Case Control Study. *Clin Psychopharmacol Neurosci*, 11 (1), 13-17.
- Joëls, M. i Baram, T. Z. (2009). The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci*, 10 (6), 459-466.
- Johnson, K. A., Barry, E., Lambert, D., Fitzgerald, M., McNicholas, F., Kirley, A., ... Hawi, Z. (2013). Methylphenidate side effect profile is influenced by genetic variation in the attention-deficit/hyperactivity disorder-associated CES1 gene. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, 23 (10), 655-664.
- Joober, R., Grizenko, N., Sengupta, S., Amor, L. B., Schmitz, N., Schwartz, G., ... Ter Stepanian, M. (2007). Dopamine transporter 3'-UTR VNTR genotype and ADHD: a pharmaco-behavioural genetic study with methylphenidate. *Neuropsychopharmacology*, 32 (6), 1370-1376.
- Kahbazi, M., Ghoreishi, A., Rahiminejad, F., Mohammadi, M. R., Kamalipour, A. i Akhondzadeh, S. (2009). A randomized, double-blind and placebo-controlled trial of modafinil in children and adolescents with attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatry Res*, 168 (3), 234-237.
- Kahn, R. S., Khoury, J., Nichols, W. C. i Lanphear, B. P. (2003). Role of dopamine transporter genotype and maternal prenatal smoking in childhood hyperactive-impulsive, inattentive, and oppositional behaviors. *J Pediatr*, 143 (1), 104-110.
- Kambeitz, J., Romanos, M. i Ettinger, U. (2014). Meta-analysis of the association between dopamine transporter genotype and response to methylphenidate treatment in ADHD. *Pharmacogenomics J*, 14 (1), 77-84.
- Kang, E., Burdick, K. E., Kim, J. Y., Duan, X., Guo, J. U., Sailor, K. A., ... Ming, G. L. (2011). Interaction between FEZ1 and DISC1 in regulation of neuronal development and risk for schizophrenia. *Neuron*, 72 (4), 559-571.
- Kaplan, G. i Newcorn, J. H. (2011). Pharmacotherapy for child and adolescent attention-deficit hyperactivity disorder. *Pediatr Clin North Am*, 58 (1), 99-120.
- Kapoor, A., Petropoulos, S. i Matthews, S. G. (2008). Fetal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis function and behavior by synthetic glucocorticoids. *Brain Res Rev*, 57 (2), 586-595.
- Kasperek, T., Theiner, P. i Filova, A. (2015). Neurobiology of ADHD From Childhood to Adulthood: Findings of Imaging Methods. *J Atten Disord*, 19 (11), 931-943.

-
- Kelly, E. A. i Fudge, J. L. (2018). The neuroanatomic complexity of the CRF and DA systems and their interface: What we still don't know. *Neurosci Biobehav Rev*, *90*, 247-259.
- Kendler, K. S. i Neale, M. C. (2010). Endophenotype: a conceptual analysis. *Mol Psychiatry*, *15* (8), 789-797.
- Kereszturi, E., Tarnok, Z., Bogнар, E., Lakatos, K., Farkas, L., Gadoros, J., ... Nemoda, Z. (2008). Catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism is associated with methylphenidate response in ADHD children. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, *147B* (8), 1431-1435.
- Kessler, R. C., Adler, L., Barkley, R., Biederman, J., Conners, C. K., Demler, O., ... Zaslavsky, A. M. (2006). The prevalence and correlates of adult ADHD in the United States: results from the National Comorbidity Survey Replication. *Am J Psychiatry*, *163* (4), 716-723.
- Kieling, C., Genro, J. P., Hutz, M. H. i Rohde, L. A. (2010). A current update on ADHD pharmacogenomics. *Pharmacogenomics*, *11* (3), 407-419.
- Kim, B. N., Cummins, T. D., Kim, J. W., Bellgrove, M. A., Hong, S. B., Song, S. H., ... Han, D. H. (2011). Val/Val genotype of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val⁶⁶Met polymorphism is associated with a better response to OROS-MPH in Korean ADHD children. *Int J Neuropsychopharmacol*, *14* (10), 1399-1410.
- Kim, B. N., Kim, J. W., Hong, S. B., Cho, S. C., Shin, M. S. i Yoo, H. J. (2010). Possible association of norepinephrine transporter -3081(A/T) polymorphism with methylphenidate response in attention deficit hyperactivity disorder. *Behav Brain Funct*, *6*, 57.
- Kim, S. W., Lee, J. H., Lee, S. H., Hong, H. J., Lee, M. G. i Yook, K. H. (2013). ABCB1 c.2677G>T variation is associated with adverse reactions of OROS-methylphenidate in children and adolescents with ADHD. *J Clin Psychopharmacol*, *33* (4), 491-498.
- Kimko, H. C., Cross, J. T. i Abernethy, D. R. (1999). Pharmacokinetics and clinical effectiveness of methylphenidate. *Clin Pharmacokinet*, *37* (6), 457-470.
- Kirley, A., Lowe, N., Hawi, Z., Mullins, C., Daly, G., Waldman, I., ... Gill, M. (2003). Association of the 480 bp DAT1 allele with methylphenidate response in a sample of Irish children with ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, *121B* (1), 50-54.

- Klassen, A. F., Miller, A. i Fine, S. (2004). Health-related quality of life in children and adolescents who have a diagnosis of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pediatrics*, 114 (5), e541-547.
- Klein, R. G., Mannuzza, S., Olazagasti, M. A., Roizen, E., Hutchison, J. A., Lashua, E. C. i Castellanos, F. X. (2012). Clinical and functional outcome of childhood attention-deficit/hyperactivity disorder 33 years later. *Arch Gen Psychiatry*, 69 (12), 1295-1303.
- Kohlhauser, C., Mosgoeller, W., Hoeger, H., Lubec, G. i Lubec, B. (1999). Cholinergic, monoaminergic and glutamatergic changes following perinatal asphyxia in the rat. *Cell Mol Life Sci*, 55 (11), 1491-1501.
- Königs, A. i Kiliaan, A. J. (2016). Critical appraisal of omega-3 fatty acids in attention-deficit/hyperactivity disorder treatment. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 12, 1869-1882.
- Kooij, J. J., Huss, M., Asherson, P., Akehurst, R., Beusterien, K., French, A., ... Hodgkins, P. (2012). Distinguishing comorbidity and successful management of adult ADHD. *J Atten Disord*, 16 (5 Suppl), 3S-19S.
- Kooij, J. S., Boonstra, A. M., Vermeulen, S. H., Heister, A. G., Burger, H., Buitelaar, J. K. i Franke, B. (2008). Response to methylphenidate in adults with ADHD is associated with a polymorphism in SLC6A3 (DAT1). *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 147B (2), 201-208.
- Koshy, G., Delpisheh, A. i Brabin, B. J. (2011). Childhood obesity and parental smoking as risk factors for childhood ADHD in Liverpool children. *Atten Defic Hyperact Disord*, 3 (1), 21-28.
- Labbe, A., Liu, A., Atherton, J., Grizenko, N., Fortier, M. È., Sengupta, S. M. i Ridha, J. (2012). Refining psychiatric phenotypes for response to treatment: contribution of LPHN3 in ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 159B (7), 776-785.
- Lachman, H. M., Papolos, D. F., Saito, T., Yu, Y. M., Szumlanski, C. L. i Weinshilboum, R. M. (1996). Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics*, 6 (3), 243-250.
- Lambers, D. S. i Clark, K. E. (1996). The maternal and fetal physiologic effects of nicotine. *Semin Perinatol*, 20 (2), 115-126.
- Lange, M., Norton, W., Coolen, M., Chaminade, M., Merker, S., Proft, F., ... Bally-Cuif, L. (2012). The ADHD-susceptibility gene lphn3.1 modulates dopaminergic neuron formation and locomotor activity during zebrafish development. *Mol Psychiatry*, 17 (9), 946-954.

- Langley, K., Heron, J., Smith, G. D. i Thapar, A. (2012). Maternal and paternal smoking during pregnancy and risk of ADHD symptoms in offspring: testing for intrauterine effects. *Am J Epidemiol*, 176 (3), 261-268.
- Langley, K., Rice, F., van den Bree, M. B. i Thapar, A. (2005). Maternal smoking during pregnancy as an environmental risk factor for attention deficit hyperactivity disorder behaviour. A review. *Minerva Pediatr*, 57 (6), 359-371.
- Langley, K., Turic, D., Peirce, T. R., Mills, S., Van Den Bree, M. B., Owen, M. J., ... Thapar, A. (2005). No support for association between the dopamine transporter (DAT1) gene and ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 139B (1), 7-10.
- Langley, K., Turic, D., Rice, F., Holmans, P., van den Bree, M. B., Craddock, N., ... Thapar, A. (2008). Testing for gene x environment interaction effects in attention deficit hyperactivity disorder and associated antisocial behavior. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 147B (1), 49-53.
- Larson, K., Russ, S. A., Kahn, R. S. i Halfon, N. (2011). Patterns of comorbidity, functioning, and service use for US children with ADHD, 2007. *Pediatrics*, 127 (3), 462-470.
- Larsson, H., Chang, Z., D'Onofrio, B. M. i Lichtenstein, P. (2014). The heritability of clinically diagnosed attention deficit hyperactivity disorder across the lifespan. *Psychol Med*, 44 (10), 2223-2229.
- Lasky-Su, J., Anney, R. J., Neale, B. M., Franke, B., Zhou, K., Maller, J. B., ... Faraone, S. V. (2008). Genome-wide association scan of the time to onset of attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 147B (8), 1355-1358.
- Lasky-Su, J., Faraone, S. V., Lange, C., Tsuang, M. T., Doyle, A. E., Smoller, J. W., ... Biederman, J. (2007). A study of how socioeconomic status moderates the relationship between SNPs encompassing BDNF and ADHD symptom counts in ADHD families. *Behav Genet*, 37 (3), 487-497.
- Lasky-Su, J., Neale, B. M., Franke, B., Anney, R. J., Zhou, K., Maller, J. B., ... Faraone, S. V. (2008). Genome-wide association scan of quantitative traits for attention deficit hyperactivity disorder identifies novel associations and confirms candidate gene associations. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 147B (8), 1345-1354.
- Laucht, M., Skowronek, M. H., Becker, K., Schmidt, M. H., Esser, G., Schulze, T. G. i Rietschel, M. (2007). Interacting effects of the dopamine transporter gene and psychosocial adversity on attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms among 15-year-olds from a high-risk community sample. *Arch Gen Psychiatry*, 64 (5), 585-590.

- Lavezzi, A. M., Corna, M. F., Repetti, M. L. i Maturri, L. (2013). Cerebellar Purkinje cell vulnerability to prenatal nicotine exposure in sudden unexplained perinatal death. *Folia Neuropathol*, 51 (4), 290-301.
- Leddy, J. J., Waxmonsky, J. G., Salis, R. J., Paluch, R. A., Gnagy, E. M., Mahaney, P., ... Epstein, L. H. (2009). Dopamine-related genotypes and the dose-response effect of methylphenidate on eating in attention-deficit/hyperactivity disorder youths. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, 19 (2), 127-136.
- Lee, S. H., Kim, S. W., Lee, M. G., Yook, K. H., Greenhill, L. L., Fradin, K. N. i Hong, H. J. (2011). Lack of association between response of OROS-methylphenidate and norepinephrine transporter (SLC6A2) polymorphism in Korean ADHD. *Psychiatry Res*, 186 (2-3), 338-344.
- Lee, T. H., Lee, C. H., Kim, I. H., Yan, B. C., Park, J. H., Kwon, S. H., ... Kim, S. K. (2012). Effects of ADHD therapeutic agents, methylphenidate and atomoxetine, on hippocampal neurogenesis in the adolescent mouse dentate gyrus. *Neurosci Lett*, 524 (2), 84-88.
- Leo, D., Sorrentino, E., Volpicelli, F., Eyman, M., Greco, D., Viggiano, D., ... Perrone-Capano, C. (2003). Altered midbrain dopaminergic neurotransmission during development in an animal model of ADHD. *Neurosci Biobehav Rev*, 27 (7), 661-669.
- Lerman, C., Audrain, J., Tercyak, K., Hawk, L. W. Jr., Bush, A., Crystal-Mansour, S., ... Epstein, L. H. (2001). Attention-Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) symptoms and smoking patterns among participants in a smoking-cessation program. *Nicotine Tob Res*, 3 (4), 353-359.
- Lesch, K. P. (2011). When the serotonin transporter gene meets adversity: the contribution of animal models to understanding epigenetic mechanisms in affective disorders and resilience. *Curr Top Behav Neurosci*, 7, 251-280.
- Lesch, K. P., Selch, S., Renner, T. J., Jacob, C., Nguyen, T. T., Hahn, T., ... Ullmann, R. (2011). Genome-wide copy number variation analysis in attention-deficit/hyperactivity disorder: association with neuropeptide Y gene dosage in an extended pedigree. *Mol Psychiatry*, 16 (5), 491-503.
- Lesch, K. P., Timmesfeld, N., Renner, T. J., Halperin, R., Röser, C., Nguyen, T. T., ... Jacob, C. (2008). Molecular genetics of adult ADHD: converging evidence from genome-wide association and extended pedigree linkage studies. *J Neural Transm (Vienna)*, 115 (11), 1573-1585.

- Levine, J. i Schooler, N. R. (1986). SAFTEE: a technique for the systematic assessment of side effects in clinical trials. *Psychopharmacol Bull*, 22 (2), 343-381.
- Levy, F. (1991). The dopamine theory of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Aust NZ J Psychiatry*, 25 (2), 277-283.
- Levy, F., Wimalaweera, S., Moul, C., Brennan, J. i Dadds, M. R. (2013). Dopamine receptors and the pharmacogenetics of side-effects of stimulant treatment for attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, 23 (6), 423-425.
- Li, D., Sham, P. C., Owen, M. J. i He, L. (2006). Meta-analysis shows significant association between dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Hum Mol Genet*, 15 (14), 2276-2284.
- Li, J. J. i Lee, S. S. (2012). Association of positive and negative parenting behavior with childhood ADHD: interactions with offspring monoamine oxidase A (MAO-A) genotype. *J Abnorm Child Psychol*, 40 (2), 165-175.
- Li, Z., Chang, S. H., Zhang, L. Y., Gao, L. i Wang, J. (2014). Molecular genetic studies of ADHD and its candidate genes: a review. *Psychiatry Res*, 219 (1), 10-24.
- Lin, J. S., Hou, Y. i Jouvett, M. (1996). Potential brain neuronal targets for amphetamine-, methylphenidate-, and modafinil-induced wakefulness, evidenced by c-fos immunocytochemistry in the cat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (24), 14128-14133.
- Linnet, K. M., Dalsgaard, S., Obel, C., Wisborg, K., Henriksen, T. B., Rodriguez, A., ... Jarvelin, M. R. (2003). Maternal lifestyle factors in pregnancy risk of attention deficit hyperactivity disorder and associated behaviors: review of the current evidence. *Am J Psychiatry*, 160 (6), 1028-1040.
- Linnet, K. M., Wisborg, K., Obel, C., Secher, N. J., Thomsen, P. H., Agerbo, E. i Henriksen, T. B. (2005). Smoking during pregnancy and the risk for hyperkinetic disorder in offspring. *Pediatrics*, 116 (2), 462-467.
- Lionel, A. C., Crosbie, J., Barbosa, N., Goodale, T., Thiruvahindrapuram, B., Rickaby, J., ... Scherer, S. W. (2011). Rare copy number variation discovery and cross-disorder comparisons identify risk genes for ADHD. *Sci Transl Med*, 3 (95), 95ra75.
- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., ... Meaney, M. J. (1997). Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, 277 (5332), 1659-1662.
- Lohoff, F. W., Narasimhan, S. i Rickels, K. (2013). Interaction between polymorphisms in serotonin transporter (SLC6A4) and serotonin receptor 2A (HTR2A) genes predict

- treatment response to venlafaxine XR in generalized anxiety disorder. *Pharmacogenomics J*, 13 (5), 464-469.
- Loidl, C. F., Herrera-Marschitz, M., Andersson, K., You, Z. B., Goiny, M., O'Connor, W. T., ... Ungerstedt, U. (1994). Long-term effects of perinatal asphyxia on basal ganglia neurotransmitter systems studied with microdialysis in rat. *Neurosci Lett*, 175 (1-2), 9-12.
- Longo, C. A., Fried, P. A., Cameron, I. i Smith, M. A. (2014). The long-term effects of prenatal nicotine exposure on verbal working memory: an fMRI study of young adults. *Drug Alcohol Depend*, 144, 61-69.
- Loro-López, M., Quintero, J., García-Campos, N., Jiménez-Gómez, B., Pando, F, Varela-Casal, P., ... Correas-Laufer, J. (2009). Update on attention-deficit/hyperactive disorder treatment. *Rev Neurol*, 49 (5), 257-264.
- Lotta, T., Vidgren, J., Tilgmann, C., Ulmanen, I., Melén, K., Julkunen, I. i Taskinen, J. (1995). Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochemistry*, 34 (13), 4202-4210.
- Lyseng-Williamson, K. A. i Keating, G. M. (2002). Extended-release methylphenidate (Ritalin LA). *Drugs*, 62 (15), 2251-2259.
- Maneeton, N., Maneeton, B., Intaprasert, S. i Woottitluk, P. (2014). A systematic review of randomized controlled trials of bupropion versus methylphenidate in the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 10, 1439-1449.
- Manolio, T. A., Collins, F. S., Cox, N. J., Goldstein, D. B., Hindorff, L. A., Hunter, D. J., ... Visscher, P. M. (2009). Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*, 461 (7265), 747-753.
- Markowitz, J. S., Zhu, H. J. i Patrick, K. S. (2013). Isopropylphenidate: an ester homolog of methylphenidate with sustained and selective dopaminergic activity and reduced drug interaction liability. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, 23 (10), 648-654.
- Martel, M. M., Nikolas, M., Jernigan, K., Friderici, K., Waldman, I. i Nigg, J. T. (2011). The dopamine receptor D4 gene (DRD4) moderates family environmental effects on ADHD. *J Abnorm Child Psychol*, 39 (1), 1-10.
- Mas, S., Llerena, A., Saíz, J., Bernardo, M. i Lafuente, A. (2012). Strengths and weaknesses of pharmacogenetic studies of antipsychotic drugs: the potential value of the PEPs study. *Pharmacogenomics*, 13 (15), 1773-1782.

- Masellis, M., Basile, V. S., Muglia, P., Ozdemir, V., Macciardi, F. M., Kennedy, J. L. (2002). Psychiatric pharmacogenetics: personalizing psychostimulant therapy in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Behav Brain Res*, 130 (1-2), 85-90.
- McCracken, J. T., Badashova, K. K., Posey, D. J., Aman, M. G., Scahill, L., Tierney, E., ... Nurmi, E. L. (2014). Positive effects of methylphenidate on hyperactivity are moderated by monoaminergic gene variants in children with autism spectrum disorders. *Pharmacogenomics J*, 14 (3), 295-302.
- McGough, J., McCracken, J., Swanson, J., Riddle, M., Kollins, S., Greenhill, L., ... Vitiello, B. (2006). Pharmacogenetics of methylphenidate response in preschoolers with ADHD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 45 (11), 1314-1322.
- McGough, J. J. (2005). Attention-deficit/hyperactivity disorder pharmacogenomics. *Biol Psychiatry*, 57 (11), 1367-1373.
- McGough, J. J., McCracken, J. T., Loo, S. K., Manganiello, M., Leung, M. C., Tietjens, J. R., ... Sugar, C. A. (2009). A candidate gene analysis of methylphenidate response in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 48 (12), 1155-1164.
- McGowan, P. O., Sasaki, A., D'Alessio, A. C., Dymov, S., Labonté, B., Szyf, M., ... Meaney, M. J. (2009). Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat Neurosci*, 12 (3), 342-348.
- Meyer, U. A. (2002). Introduction to pharmacogenomics: Promises, opportunities, and limitations. A J. Licino i M. Wong (eds.), *Pharmacogenomics: The Search for Individualized Therapies* (pp. 1-8). Weinheim (Alemanya): Wiley-VCH.
- Mick, E., Biederman, J., Spencer, T., Faraone, S. V. i Sklar, P. (2006). Absence of association with DAT1 polymorphism and response to methylphenidate in a sample of adults with ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 141B (8), 890-894.
- Mick, E., McGough, J. J., Middleton, F. A., Neale, B. i Faraone, S. V. (2011). Genome-wide association study of blood pressure response to methylphenidate treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 35 (2), 466-472.
- Mick, E., Neale, B., Middleton, F. A., McGough, J. J. i Faraone, S. V. (2008). Genome-wide association study of response to methylphenidate in 187 children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 147B (8), 1412-1418.

- Mick, E., Todorov, A., Smalley, S., Hu, X., Loo, S., Todd, R. D., ... Faraone, S. V. (2010). Family-based genome-wide association scan of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 49 (9), 898-905.
- Middeldorp, C. M., Hammerschlag, A. R., Ouwens, K. G., Groen-Blokhuis, M. M., Pourcain, B. S., Greven, C. U., ... Boomsma, D. I. (2016). A Genome-Wide Association Meta-Analysis of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Symptoms in Population-Based Pediatric Cohorts. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 55 (10), 896-905.e6.
- Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M. i Caron, M. G. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*, 78 (1), 189-225.
- Moffitt, T. E., Caspi, A., Taylor, A., Kokaua, J., Milne, B. J., Polanczyk, G. i Poulton, R. (2010). How common are common mental disorders? Evidence that lifetime prevalence rates are doubled by prospective versus retrospective ascertainment. *Psychol Med*, 40 (6), 899-909.
- Mongia, M. i Hechtman, L. (2012). Cognitive behavior therapy for adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: a review of recent randomized controlled trials. *Curr Psychiatry Rep*, 14 (5), 561-567.
- Montañés-Rada, F., Gangoso-Fermoso, A. B. i Martínez-Granero, M. A. (2009). Drugs for attention deficit hyperactivity disorder. *Rev Neurol*, 48 (9), 469-481.
- Morrison, J. R. i Stewart, M. A. (1973). The psychiatric status of the legal families of adopted hyperactive children. *Arch Gen Psychiatry*, 28 (6), 888-891.
- MTA Cooperative Group. (1999). A 14-month randomized clinical trial of treatment strategies for attention-deficit/hyperactivity disorder. The MTA Cooperative Group. Multimodal Treatment Study of Children with ADHD. *Arch Gen Psychiatry*, 56 (12), 1073-1086.
- Müller, D. J., Mandelli, L., Serretti, A., DeYoung, C. G., De Luca, V., Sicard, T., ... Kennedy, J. L. (2008). Serotonin transporter gene and adverse life events in adult ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 147B (8), 1461-1469.
- Muneoka, K., Ogawa, T., Kamei, K., Muraoka, S., Tomiyoshi, R., Mimura, Y., ... Takigawa, M. (1997). Prenatal nicotine exposure affects the development of the central serotonergic system as well as the dopaminergic system in rat offspring: involvement of route of drug administrations. *Brain Res Dev Brain Res*, 102 (1), 117-126.

- Myer, N. M., Boland, J. R. i Faraone, S. V. (2017). Pharmacogenetics predictors of methylphenidate efficacy in childhood ADHD. *Mol Psychiatry*. E-pub ahead of print Dec 12. doi: 10.1038/mp.2017.234.
- National Institutes of Health. (2000). National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: diagnosis and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 39 (2), 182-193.
- Naumova, D., Grizenko, N., Sengupta, S. M. i Joobert, R. (2017). DRD4 exon 3 genotype and ADHD: Randomised pharmacodynamic investigation of treatment response to methylphenidate. *World J Biol Psychiatry*. E-pub ahead of print Dec 15. doi: 10.1080/15622975.2017.1410221.
- Neale, B. M., Lasky-Su, J., Anney, R., Franke, B., Zhou, K., Maller, J. B., ... Faraone, S. V. (2008). Genome-wide association scan of attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 147B (8), 1337-1344.
- Neale, B. M., Medland, S., Ripke, S., Anney, R. J., Asherson, P., Buitelaar, J., ... IMAGE II Consortium Group. (2010). Case-control genome-wide association study of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 49 (9), 906-920.
- Neale, B. M., Medland, S. E., Ripke, S., Asherson, P., Franke, B., Lesch, K. P., ... Psychiatric GWAS Consortium: ADHD Subgroup. (2010). Meta-analysis of genome-wide association studies of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 49 (9), 884-897.
- Nemoda, Z., Angyal, N., Tarnok, Z., Gadoros, J. i Sasvari-Szekely, M. (2009). Carboxylesterase 1 gene polymorphism and methylphenidate response in ADHD. *Neuropharmacology*, 57 (7-8), 731-733.
- Neuman, R. J., Lobos, E., Reich, W., Henderson, C. A., Sun, L. W. i Todd, R. D. (2007). Prenatal smoking exposure and dopaminergic genotypes interact to cause a severe ADHD subtype. *Biol Psychiatry*, 61 (12), 1320-1328.
- Newcorn, J. H., Kratochvil, C. J., Allen, A. J., Casat, C. D., Ruff, D. D., Moore, R. J., ... Atomoxetine/Methylphenidate Comparative Study Group. (2008). Atomoxetine and osmotically released methylphenidate for the treatment of attention deficit hyperactivity disorder: acute comparison and differential response. *Am J Psychiatry*, 165 (6), 721-730.

- Nigg, J., Nikolas, M. i Burt, S. A. (2010). Measured gene-by-environment interaction in relation to attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 49 (9), 863-873.
- Nigg, J. T. (2008). ADHD, lead exposure and prevention: how much lead or how much evidence is needed? *Expert Rev Neurother*, 8 (4), 519-521.
- Nigg, J. T. i Holton, K. (2014). Restriction and elimination diets in ADHD treatment. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*, 23 (4), 937-953.
- Nigg, J. T., Nikolas, M., Mark Knottnerus, G., Cavanagh, K. i Friderici, K. (2010). Confirmation and extension of association of blood lead with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and ADHD symptom domains at population-typical exposure levels. *J Child Psychol Psychiatry*, 51 (1), 58-65.
- Nikolaidis, A. i Gray, J. R. (2010). ADHD and the DRD4 exon III 7-repeat polymorphism: an international meta-analysis. *Soc Cogn Affect Neurosci*, 5 (2-3), 188-193.
- Noaín, D., Avale, M. E., Wedemeyer, C., Calvo, D., Peper, M. i Rubinstein, M. (2006). Identification of brain neurons expressing the dopamine D4 receptor gene using BAC transgenic mice. *Eur J Neurosci*, 24 (9), 2429-2438.
- O'Dowd, B. F. (1993). Structures of dopamine receptors. *J Neurochem*, 60 (3), 804-816.
- Oades, R. D. (2008). Dopamine-serotonin interactions in attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Prog Brain Res*, 172, 543-565.
- Ogdie, M. N., Bakker, S. C., Fisher, S. E., Francks, C., Yang, M. H., Cantor, R. M., ... Smalley, S. L. (2006). Pooled genome-wide linkage data on 424 ADHD ASPs suggests genetic heterogeneity and a common risk locus at 5p13. *Mol Psychiatry*, 11 (1), 5-8.
- Ogdie, M. N., Fisher, S. E., Yang, M., Ishii, J., Francks, C., Loo, S. K., ... Nelson, S. F. (2004). Attention deficit hyperactivity disorder: fine mapping supports linkage to 5p13, 6q12, 16p13, and 17p11. *Am J Hum Genet*, 75 (4), 661-668.
- Ogdie, M. N., Macphie, I. L., Minassian, S. L., Yang, M., Fisher, S. E., Francks, C., ... Smalley, S. L. (2003). A genomewide scan for attention-deficit/hyperactivity disorder in an extended sample: suggestive linkage on 17p11. *Am J Hum Genet*, 72 (5), 1268-1279.
- Park, C., Falls, W., Finger, J. H., Longo-Guess, C. M. i Ackerman, S. L. (2002). Deletion in *Catna2*, encoding alpha N-catenin, causes cerebellar and hippocampal lamination defects and impaired startle modulation. *Nat Genet*, 31 (3), 279-284.

- Park, M. H., Kim, J. W., Yang, Y. H., Hong, S. B., Park, S., Kang, H., ... Cho, S. C. (2012). Regional brain perfusion before and after treatment with methylphenidate may be associated with the G1287A polymorphism of the norepinephrine transporter gene in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Neurosci Lett*, 514 (2), 159-163.
- Park, S., Kim, B. N., Kim, J. W., Shin, M. S., Cho, S. C., Kim, J. H., ... Han, D. H. (2014). Neurotrophin 3 genotype and emotional adverse effects of osmotic-release oral system methylphenidate (OROS-MPH) in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Psychopharmacol*, 28 (3), 220-226.
- Park, S. Y., Kim, E. J. i Cheon, K. A. (2015). Association Between 5-HTTLPR Polymorphism and Tics after Treatment with Methylphenidate in Korean Children with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, 25 (8), 633-640.
- Patrick, K. S., Caldwell, R. W., Ferris, R. M. i Breese, G. R. (1987). Pharmacology of the enantiomers of threo-methylphenidate. *J Pharmacol Exp Ther*, 241 (1), 152-158.
- Patrick, K. S., Straughn, A. B., Minhinnett, R. R., Yeatts, S. D., Herrin, A. E., DeVane, C. L., ... Markowitz, J. S. (2007). Influence of ethanol and gender on methylphenidate pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther*, 81 (3), 346-353.
- Penner, M. R., McFadyen, M. P., Pinaud, R., Carrey, N., Robertson, H. A. i Brown, R. E. (2002). Age-related distribution of c-fos expression in the striatum of CD-1 mice after acute methylphenidate administration. *Brain Res Dev Brain Res*, 135 (1-2), 71-77.
- Pennington, B. F., McGrath, L. M., Rosenberg, J., Barnard, H., Smith, S. D., Willcutt, E. G., ... Olson, R. K. (2009). Gene X environment interactions in reading disability and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Dev Psychol*, 45 (1), 77-89.
- Penzes, P. i Jones, K. A. (2008). Dendritic spine dynamics—a key role for kalirin-7. *Trends Neurosci*, 31 (8), 419-427.
- Pettersson, F. H., Anderson, C. A., Clarke, G. M., Barrett, J. C., Cardon, L. R., Morris, A. P. i Zondervan, K. T. (2009). Marker selection for genetic case-control association studies. *Nat Protoc*, 4 (5), 743-752.
- Pfiffner, L. J. i Haack, L. M. (2014). Behavior management for school-aged children with ADHD. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*, 23 (4), 731-746.

- Phillips, K. A., Veenstra, D. L. i Sadee, W. (2000). Implications of the genetics revolution for health services research: pharmacogenomics and improvements in drug therapy. *Health Serv Res*, 35 (5 Pt 3), 128-140.
- Pletnikov, M. V., Rubin, S. A., Vogel, M. W., Moran, T. H. i Carbone, K. M. (2002a). Effects of genetic background on neonatal Borna disease virus infection-induced neurodevelopmental damage. I. Brain pathology and behavioral deficits. *Brain Res*, 944 (1-2), 97-107.
- Pletnikov, M. V., Rubin, S. A., Vogel, M. W., Moran, T. H. i Carbone, K. M. (2002b). Effects of genetic background on neonatal Borna disease virus infection-induced neurodevelopmental damage. II. Neurochemical alterations and responses to pharmacological treatments. *Brain Res*, 944 (1-2), 108-123.
- Pliszka, S. i AACAP Work Group on Quality Issues. (2007). Practice parameter for the assessment and treatment of children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 46 (7), 894-921.
- Poelmans, G., Pauls, D. L., Buitelaar, J. K. i Franke, B. (2011). Integrated genome-wide association study findings: identification of a neurodevelopmental network for attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry*, 168 (4), 365-377.
- Polanczyk, G., de Lima, M. S., Horta, B. L., Biederman, J. i Rohde, L. A. (2007). The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry*, 164 (6), 942-948.
- Polanczyk, G., Zeni, C., Genro, J. P., Guimarães, A. P., Roman, T., Hutz, M. H. i Rohde, L. A. (2007). Association of the adrenergic alpha2A receptor gene with methylphenidate improvement of inattentive symptoms in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 64 (2), 218-224.
- Purper-Ouakil, D., Wohl, M., Orejarena, S., Cortese, S., Boni, C., Asch, M., ... Gorwood, P. (2008). Pharmacogenetics of methylphenidate response in attention deficit/hyperactivity disorder: association with the dopamine transporter gene (SLC6A3). *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 147B (8), 1425-1430.
- Raber, J., Mehta, P. P., Kreifeldt, M., Parsons, L. H., Weiss, F., Bloom, F. E. i Wilson, M. C. (1997). Coloboma hyperactive mutant mice exhibit regional and transmitter-specific deficits in neurotransmission. *J Neurochem*, 68 (1), 176-186.
- Rahman, M. A., Ashton, A. C., Meunier, F. A., Davletov, B. A., Dolly, J. O. i Ushkaryov, Y. A. (1999). Norepinephrine exocytosis stimulated by alpha-latrotoxin requires both

- external and stored Ca²⁺ and is mediated by latrophilin, G proteins and phospholipase C. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 354 (1381), 379-386.
- Retz, W., Freitag, C. M., Retz-Junginger, P., Wenzler, D., Schneider, M., Kissling, C., ... Rösler, M. (2008). A functional serotonin transporter promoter gene polymorphism increases ADHD symptoms in delinquents: interaction with adverse childhood environment. *Psychiatry Res*, 158 (2), 123-131.
- Ribasés, M., Hervás, A., Ramos-Quiroga, J. A., Bosch, R., Bielsa, A., Gastaminza, X., ... Bayés, M. (2008). Association study of 10 genes encoding neurotrophic factors and their receptors in adult and child attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*, 63 (10), 935-945.
- Roman, T., Szobot, C., Martins, S., Biederman, J., Rohde, L. A. i Hutz, M. H. (2002). Dopamine transporter gene and response to methylphenidate in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pharmacogenetics*, 12 (6), 497-499.
- Rosenberg, J., Pennington, B. F., Willcutt, E. G. i Olson, R. K. (2012). Gene by environment interactions influencing reading disability and the inattentive symptom dimension of attention deficit/hyperactivity disorder. *J Child Psychol Psychiatry*, 53 (3), 243-251.
- Rostain, A., Jensen, P. S., Connor, D. F., Miesle, L. M. i Faraone, S. V. (2015). Toward quality care in ADHD: defining the goals of treatment. *J Atten Disord*, 19 (2), 99-117.
- Rovaris, D. L., Mota, N. R., da Silva, B. S., Girardi, P., Victor, M. M., Grevet, E. H., ... Contini, V. (2014). Should we keep on? Looking into pharmacogenomics of ADHD in adulthood from a different perspective. *Pharmacogenomics*, 15 (10), 1365-1381.
- Russell, V. A. (2000). The nucleus accumbens motor-limbic interface of the spontaneously hypertensive rat as studied in vitro by the superfusion slice-technique. *Neurosci Biobehav Rev*, 24 (1), 133-136.
- Ryu, S., Oh, S., Cho, E. Y., Nam, H. J., Yoo, J. H., Park, T., ... Hong, K. S. (2011). Interaction between genetic variants of DLGAP3 and SLC1A1 affecting the risk of atypical antipsychotics-induced obsessive-compulsive symptoms. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 156B (8), 949-959.
- Sagvolden, T. (2000). Behavioral validation of the spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (AD/HD). *Neurosci Biobehav Rev*, 24 (1), 31-39.

- Sagvolden, T., Johansen, E. B., Aase, H. i Russell, V. A. (2005). A dynamic developmental theory of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) predominantly hyperactive/impulsive and combined subtypes. *Behav Brain Sci*, 28 (3), 397-419.
- Salatino-Oliveira, A., Genro, J. P., Polanczyk, G., Zeni, C., Schmitz, M., Kieling, C., ... Hutz, M. H. (2015). Cadherin-13 is associated with hyperactive/impulsive symptoms in attention/deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 168B (3), 162-169.
- Salatino-Oliveira, A., Genro, J. P., Zeni, C., Polanczyk, G. V., Chazan, R., Guimarães, A. P., ... Hutz, M. H. (2011). Catechol-O-methyltransferase valine158methionine polymorphism moderates methylphenidate effects on oppositional symptoms in boys with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*, 70 (3), 216-221.
- Sallee, F., Connor, D. F. i Newcorn, J. H. (2013). A review of the rationale and clinical utilization of α 2-adrenoreceptor agonists for the treatment of attention-deficit/hyperactivity and related disorders. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, 23 (5), 308-319.
- Sánchez-Mora, C., Cormand, B., Ramos-Quiroga, J. A., Hervás, A., Bosch, R., Palomar, G., ... Ribasés, M. (2013). Evaluation of common variants in 16 genes involved in the regulation of neurotransmitter release in ADHD. *Eur Neuropsychopharmacol*, 23 (6), 426-435.
- Sánchez-Mora, C., Ramos-Quiroga, J. A., Bosch, R., Corrales, M., Garcia-Martínez, I., Nogueira, M., ... Ribasés, M. (2015). Case-control genome-wide association study of persistent attention-deficit hyperactivity disorder identifies FBXO33 as a novel susceptibility gene for the disorder. *Neuropsychopharmacology*, 40 (4), 915-926.
- Sanchez, J. J., Phillips, C., Børsting, C., Balogh, K., Bogus, M., Fondevila, M., ... Morling, N. (2006). A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. *Electrophoresis*, 27 (9), 1713-1724.
- Schantz, S. L., Widholm, J. J. i Rice, D. C. (2003). Effects of PCB exposure on neuropsychological function in children. *Environ Health Perspect*, 111 (3), 357-576.
- Schlomer, G. L., Cleveland, H. H., Vandenberg, D. J., Feinberg, M. E., Neiderhiser, J. M., Greenberg, M. T., ... Redmond, C. (2015). Developmental differences in early adolescent aggression: a gene \times environment \times intervention analysis. *J Youth Adolesc*, 44 (3), 581-597.
- Schwartz, S. i Correll, C. U. (2014). Efficacy and safety of atomoxetine in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder: results from a

- comprehensive meta-analysis and metaregression. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 53 (2), 174-187.
- Seeger, G., Schloss, P. i Schmidt, M. H. (2001). Marker gene polymorphisms in hyperkinetic disorder—predictors of clinical response to treatment with methylphenidate? *Neurosci Lett*, 313 (1-2), 45-48.
- Seipel, A. T. i Yakel, J. L. (2010). The frequency-dependence of the nicotine-induced inhibition of dopamine is controlled by the $\alpha 7$ nicotinic receptor. *J Neurochem*, 114 (6), 1659-1666.
- Silva, D., Colvin, L., Hagemann, E. i Bower, C. (2014). Environmental risk factors by gender associated with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pediatrics*, 133 (1), e14-22.
- Simon, V., Czobor, P., Bálint, S., Mészáros, A. i Bitter, I. (2009). Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis. *Br J Psychiatry*, 194 (3), 204-211.
- Singh, A., Yeh, C. J., Verma, N. i Das, A. K. (2015). Overview of Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Young Children. *Health Psychol Res*, 3 (2), 2115.
- Slikker, W. Jr., Xu, Z. A., Levin, E. D. i Slotkin, T. A. (2005). Mode of action: disruption of brain cell replication, second messenger, and neurotransmitter systems during development leading to cognitive dysfunction—developmental neurotoxicity of nicotine. *Crit Rev Toxicol*, 35 (8-9), 703-711.
- Smalley, S. L., Kustanovich, V., Minassian, S. L., Stone, J. L., Ogdie, M. N., McGough, J. J., ... Nelson, S. F. (2002). Genetic linkage of attention-deficit/hyperactivity disorder on chromosome 16p13, in a region implicated in autism. *Am J Hum Genet*, 71 (4), 959-963.
- Smith, A. M., Dwoskin, L. P. i Pauly, J. R. (2010). Early exposure to nicotine during critical periods of brain development: Mechanisms and consequences. *J Pediatr Biochem*, 1 (2), 125-141.
- Sobanski, E. (2006). Psychiatric comorbidity in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 256 (Suppl 1), i26-31.
- Söllner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. i Rothman, J. E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*, 362 (6418), 318-324.
- Song, J., Kim, S. W., Hong, H. J., Lee, M. G., Lee, B. W., Choi, T. K., ... Yook, K. H. (2014). Association of SNAP-25, SLC6A4, and LPHN3 with OROS

- methylphenidate treatment response in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Clin Neuropharmacol*, 37 (5), 136-141.
- Song, J., Song, D. H., Jung, K. i Cheon, K. A. (2011). Norepinephrine transporter gene (SLC6A2) is involved with methylphenidate response in Korean children with attention deficit hyperactivity disorder. *Int Clin Psychopharmacol*, 26 (2), 107-113.
- Sonuga-Barke, E., Brandeis, D., Holtmann, M. i Cortese, S. (2014). Computer-based cognitive training for ADHD: a review of current evidence. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*, 23 (4), 807-824.
- Sonuga-Barke, E. J., Brandeis, D., Cortese, S., Daley, D., Ferrin, M., Holtmann, M., ... European ADHD Guidelines Group. (2013). Nonpharmacological interventions for ADHD: systematic review and meta-analyses of randomized controlled trials of dietary and psychological treatments. *Am J Psychiatry*, 170 (3), 275-289.
- Sonuga-Barke, E. J., Oades, R. D., Psychogiou, L., Chen, W., Franke, B., Buitelaar, J., ... Faraone, S. V. (2009). Dopamine and serotonin transporter genotypes moderate sensitivity to maternal expressed emotion: the case of conduct and emotional problems in attention deficit/hyperactivity disorder. *J Child Psychol Psychiatry*, 50 (9), 1052-1063.
- Spencer, T., Biederman, J. i Wilens, T. (2004). Nonstimulant treatment of adult attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychiatr Clin North Am*, 27 (2), 373-383.
- Spencer, T. J. (2006). ADHD and comorbidity in childhood. *J Clin Psychiatry*, 67 (Suppl 8), 27-31.
- Spencer, T. J., Biederman, J., Madras, B. K., Faraone, S. V., Dougherty, D. D., Bonab, A. A. i Fischman, A. J. (2005). In vivo neuroreceptor imaging in attention-deficit/hyperactivity disorder: a focus on the dopamine transporter. *Biol Psychiatry*, 57 (11), 1293-1300.
- Sprich, S., Biederman, J., Crawford, M. H., Mundy, E. i Faraone, S. V. (2000). Adoptive and biological families of children and adolescents with ADHD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 39 (11), 1432-1437.
- Steele, M., Jensen, P. S. i Quinn, D. M. (2006). Remission versus response as the goal of therapy in ADHD: a new standard for the field? *Clin Ther*, 28 (11), 1892-1908.
- Stein, M. A. i McGough, J. J. (2008). The pharmacogenomic era: promise for personalizing attention deficit hyperactivity disorder therapy. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*, 17 (2), 475-490.

- Stein, M. A., Waldman, I., Newcorn, J., Bishop, J., Kittles, R. i Cook, E. H. Jr. (2014). Dopamine transporter genotype and stimulant dose-response in youth with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, 24 (5), 238-244.
- Stein, M. A., Waldman, I. D., Sarampote, C. S., Seymour, K. E., Robb, A. S., Conlon, C., ... Cook, E. H. (2005). Dopamine transporter genotype and methylphenidate dose response in children with ADHD. *Neuropsychopharmacology*, 30 (7), 1374-1382.
- Stergiakouli, E., Hamshere, M., Holmans, P., Langley, K., Zaharieva, I., deCODE Genetics, ... Thapar, A. (2012). Investigating the contribution of common genetic variants to the risk and pathogenesis of ADHD. *Am J Psychiatry*, 169 (2), 186-194.
- Stevens, J. R., Wilens, T. E. i Stern, T. A. (2013). Using stimulants for attention-deficit/hyperactivity disorder: clinical approaches and challenges. *Prim Care Companion CNS Disord*, 15 (2).
- Stevens, S. E., Kumsta, R., Kreppner, J. M., Brookes, K. J., Rutter, M. i Sonuga-Barke, E. J. (2009). Dopamine transporter gene polymorphism moderates the effects of severe deprivation on ADHD symptoms: developmental continuities in gene-environment interplay. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 150B (6), 753-761.
- Stevenson, J., Buitelaar, J., Cortese, S., Ferrin, M., Konofal, E., Lecendreux, M., ... Sonuga-Barke, E. (2014). Research review: the role of diet in the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder—an appraisal of the evidence on efficacy and recommendations on the design of future studies. *J Child Psychol Psychiatry*, 55 (5), 416-427.
- Stevenson, R. D. i Wolraich, M. L. (1989). Stimulant medication therapy in the treatment of children with attention deficit hyperactivity disorder. *Pediatr Clin North Am*, 36 (5), 1183-1197.
- Südhof, T. C. (2013). Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*, 80 (3), 675-690.
- Sullivan, D., Pinsonneault, J. K., Papp, A. C., Zhu, H., Lemeshow, S., Mash, D. C. i Sadee, W. (2013). Dopamine transporter DAT and receptor DRD2 variants affect risk of lethal cocaine abuse: a gene-gene environment interaction. *Transl Psychiatry*, 3, e222.
- Sullivan, R. M. (2004). Hemispheric asymmetry in stress processing in rat prefrontal cortex and the role of mesocortical dopamine. *Stress*, 7 (2), 131-143.
- Sullivan, R. M. i Dufresne, M. M. (2006). Mesocortical dopamine and HPA axis regulation: role of laterality and early environment. *Brain Res*, 1076 (1), 49-59.

- Sun, Z., Murry, D. J., Sanghani, S. P., Davis, W. I., Kedishvili, N. Y., Zou, Q., ... Bosron, W. F. (2004). Methylphenidate is stereoselectively hydrolyzed by human carboxylesterase CES1A1. *J Pharmacol Exp Ther*, 310 (2), 469-476.
- Tahir, E., Yazgan, Y., Cirakoglu, B., Ozbay, F., Waldman, I. i Asherson, P. J. (2000). Association and linkage of DRD4 and DRD5 with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in a sample of Turkish children. *Mol Psychiatry*, 5 (4), 396-404.
- Tanaka, Y., Rohde, L. A., Jin, L., Feldman, P. D. i Upadhyaya, H. P. (2013). A meta-analysis of the consistency of atomoxetine treatment effects in pediatric patients with attention-deficit/hyperactivity disorder from 15 clinical trials across four geographic regions. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, 23 (4), 262-270.
- Teicher, M. H., Anderson, C. M., Polcari, A., Glod, C. A., Maas, L. C. i Renshaw, P. F. (2000). Functional deficits in basal ganglia of children with attention-deficit/hyperactivity disorder shown with functional magnetic resonance imaging relaxometry. *Nat Med*, 6 (4), 470-473.
- Thakur, G. A., Grizenko, N., Sengupta, S. M., Schmitz, N. i Joobar, R. (2010). The 5-HTTLPR polymorphism of the serotonin transporter gene and short term behavioral response to methylphenidate in children with ADHD. *BMC Psychiatry*, 10, 50.
- Thakur, G. A., Sengupta, S. M., Grizenko, N., Choudhry, Z. i Joobar, R. (2012). Comprehensive phenotype/genotype analyses of the norepinephrine transporter gene (SLC6A2) in ADHD: relation to maternal smoking during pregnancy. *PLoS One*, 7 (11), e49616.
- Thapar, A., Cooper, M., Eyre, O. i Langley, K. (2013). What have we learnt about the causes of ADHD? *J Child Psychol Psychiatry*, 54 (1), 3-16.
- Thapar, A., Cooper, M., Jefferies, R. i Stergiakouli, E. (2012). What causes attention deficit hyperactivity disorder? *Arch Dis Child*, 97 (3), 260-265.
- Thapar, A., Fowler, T., Rice, F., Scourfield, J., van den Bree, M., Thomas, H., ... Hay, D. (2003). Maternal smoking during pregnancy and attention deficit hyperactivity disorder symptoms in offspring. *Am J Psychiatry*, 160 (11), 1985-1989.
- Thapar, A., Langley, K., Fowler, T., Rice, F., Turic, D., Whittinger, N., ... O'Donovan, M. (2005). Catechol O-methyltransferase gene variant and birth weight predict early-onset antisocial behavior in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 62 (11), 1275-1278.

- Thapar, A., Rice, F., Hay, D., Boivin, J., Langley, K., van den Bree, M., ... Harold, G. (2009). Prenatal smoking might not cause attention-deficit/hyperactivity disorder: evidence from a novel design. *Biol Psychiatry*, *66* (8), 722-727.
- Tharoor, H., Lobos, E. A., Todd, R. D. i Reiersen, A. M. (2008). Association of dopamine, serotonin, and nicotinic gene polymorphisms with methylphenidate response in ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, *147B* (4), 527-530.
- Tiesler, C. M. i Heinrich, J. (2014). Prenatal nicotine exposure and child behavioural problems. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, *23* (10), 913-929.
- Todd, R. D. i Neuman, R. J. (2007). Gene-environment interactions in the development of combined type ADHD: evidence for a synapse-based model. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, *144B* (8), 971-975.
- Treuer, T., Gau, S. S., Méndez, L., Montgomery, W., Monk, J. A., Altin, M., ... Dueñas, H. J. (2013). A systematic review of combination therapy with stimulants and atomoxetine for attention-deficit/hyperactivity disorder, including patient characteristics, treatment strategies, effectiveness, and tolerability. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, *23* (3), 179-193.
- Treutlein, J. i Rietschel, M. (2011). Genome-wide association studies of alcohol dependence and substance use disorders. *Curr Psychiatry Rep*, *13* (2), 147-155.
- Trinh, J. V., Nehrenberg, D. L., Jacobsen, J. P., Caron, M. G. i Wetsel, W. C. (2003). Differential psychostimulant-induced activation of neural circuits in dopamine transporter knockout and wild type mice. *Neuroscience*, *118* (2), 297-310.
- van der Meulen, E. M., Bakker, S. C., Pauls, D. L., Oteman, N., Kruitwagen, C. L., Pearson, P. L., ... Buitelaar, J. K. (2005). High sibling correlation on methylphenidate response but no association with DAT1-10R homozygosity in Dutch sibpairs with ADHD. *J Child Psychol Psychiatry*, *46* (10), 1074-1080.
- van der Meulen, E. M., Bakker, S. C., Pauls, D. L., Sinnke, R. J. i Buitelaar, J. (2004). A genome-wide quantitative trait locus analysis on methylphenidate response rate in Dutch sibpairs with attention-deficit/hyperactivity disorder. *16th World Congress of the International Association for Child and Adolescent Psychiatry and Allied Professions*. Berlín, 22-26 d'agost.
- Verbeeck, W., Tuinier, S. i Bekkering, G. E. (2009). Antidepressants in the treatment of adult attention-deficit hyperactivity disorder: a systematic review. *Adv Ther*, *26* (2), 170-184.

- Volkow, N. D. i Swanson, J. M. (2013). Clinical practice: Adult attention deficit-hyperactivity disorder. *N Engl J Med*, 369 (20), 1935-1944.
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Newcorn, J., Telang, F., Solanto, M. V., Fowler, J. S., ... Swanson, J. M. (2007). Depressed dopamine activity in caudate and preliminary evidence of limbic involvement in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 64 (8), 932-940.
- Waldman, I. D. (2007). Gene-environment interactions reexamined: does mother's marital stability interact with the dopamine receptor D2 gene in the etiology of childhood attention-deficit/hyperactivity disorder? *Dev Psychopathol*, 19 (4), 1117-1128.
- Wallis, D., Hill, D. S., Mendez, I. A., Abbott, L. C., Finnell, R. H., Wellman, P. J. i Setlow, B. (2012). Initial characterization of mice null for *Lphn3*, a gene implicated in ADHD and addiction. *Brain Res*, 1463, 85-92.
- Walther, D. J., Peter, J. U., Bashammakh, S., Hörtnagl, H., Voits, M., Fink, H. i Bader, M. (2003). Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*, 299 (5603), 76.
- Warikoo, N. i Faraone, S. V. (2013). Background, clinical features and treatment of attention deficit hyperactivity disorder in children. *Expert Opin Pharmacother*, 14 (14), 1885-1906.
- Warren, A. E., Hamilton, R. M., Bélanger, S. A., Gray, C., Gow, R. M., Sanatani, S., ... Schachar, R. (2009). Cardiac risk assessment before the use of stimulant medications in children and youth: A joint position statement by the Canadian Paediatric Society, the Canadian Cardiovascular Society, and the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry. *Can J Cardiol*, 25 (11), 625-630.
- Weaver, I. C., Cervoni, N., Champagne, F. A., D'Alessio, A. C., Sharma, S., Seckl, J. R., ... Meaney, M. J. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci*, 7 (8), 847-854.
- Weaver, I. C., D'Alessio, A. C., Brown, S. E., Hellstrom, I. C., Dymov, S., Sharma, S., ... Meaney, M. J. (2007). The transcription factor nerve growth factor-inducible protein 1 mediates epigenetic programming: altering epigenetic marks by immediate-early genes. *J Neurosci*, 27 (7), 1756-1768.
- Weinshilboum, R. (2003). Inheritance and drug response. *N Engl J Med*, 348 (6), 529-537.
- Weitzman, M., Byrd, R. S., Aligne, C. A. i Moss, M. (2002). The effects of tobacco exposure on children's behavioral and cognitive functioning: implications for clinical and public health policy and future research. *Neurotoxicol Teratol*, 24 (3), 397-406.

- Wermter, A. K., Laucht, M., Schimmelmann, B. G., Banaschewski, T., Sonuga-Barke, E. J., Rietschel, M. i Becker, K. (2010). From nature versus nurture, via nature and nurture, to gene x environment interaction in mental disorders. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 19 (3), 199-210.
- Wigal, S. B. (2009). Efficacy and safety limitations of attention-deficit hyperactivity disorder pharmacotherapy in children and adults. *CNS Drugs*, 23 (Suppl 1), 21-31.
- Wilens, T. E., Biederman, J., Baldessarini, R. J., Geller, B., Schleifer, D., Spencer, T. J., ... Goldblatt, A. (1996). Cardiovascular effects of therapeutic doses of tricyclic antidepressants in children and adolescents. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 35 (11), 1491-1501.
- Wilens, T. E., Biederman, J., Spencer, T. J., Frazier, J., Prince, J., Bostic, J., ... Abrantes, A. (1999). Controlled trial of high doses of pemoline for adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychopharmacol*, 19 (3), 257-264.
- Willcutt, E. G. (2012). The prevalence of DSM-IV attention-deficit/hyperactivity disorder: a meta-analytic review. *Neurotherapeutics*, 9 (3), 490-499.
- Williams, N. M., Franke, B., Mick, E., Anney, R. J., Freitag, C. M., Gill, M., ... Faraone, S. V. (2012). Genome-wide analysis of copy number variants in attention deficit hyperactivity disorder: the role of rare variants and duplications at 15q13.3. *Am J Psychiatry*, 169 (2), 195-204.
- Williams, N. M., Zaharieva, I., Martin, A., Langley, K., Mantripragada, K., Fossdal, R., ... Thapar, A. (2010). Rare chromosomal deletions and duplications in attention-deficit hyperactivity disorder: a genome-wide analysis. *Lancet*, 376 (9750), 1401-1408.
- Winsberg, B. G. i Comings, D. E. (1999). Association of the dopamine transporter gene (DAT1) with poor methylphenidate response. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 38 (12), 1474-1477.
- Wolraich, M. L. i Doffing, M. A. (2004). Pharmacokinetic considerations in the treatment of attention-deficit hyperactivity disorder with methylphenidate. *CNS Drugs*, 18 (4), 243-250.
- Wolraich, M. L., Greenhill, L. L., Pelham, W., Swanson, J., Wilens, T., Palumbo, D., ... August, G. (2001). Randomized, controlled trial of oros methylphenidate once a day in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pediatrics*, 108 (4), 883-892.
- Yang, L., Neale, B. M., Liu, L., Lee, S. H., Wray, N. R., Ji, N., ... Psychiatric GWAS Consortium ADHD Subgroup. (2013). Polygenic transmission and complex neuro developmental network for attention deficit hyperactivity disorder: genome-wide

- association study of both common and rare variants. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 162B (5), 419-430.
- Yang, L., Wang, Y. F., Li, J. i Faraone, S. V. (2004). Association of norepinephrine transporter gene with methylphenidate response. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 43 (9), 1154-1158.
- Yano, M. i Steiner, H. (2005a). Methylphenidate (Ritalin) induces Homer 1a and zif 268 expression in specific corticostriatal circuits. *Neuroscience*, 132 (3), 855-865.
- Yano, M. i Steiner, H. (2005b). Topography of methylphenidate (ritalin)-induced gene regulation in the striatum: differential effects on c-fos, substance P and opioid peptides. *Neuropsychopharmacology*, 30 (5), 901-915.
- Zayats, T., Anthanasiu, L., Sonderby, I., Djurovic, S., Westlye, L. T., Tamnes, C. K., ... Haavik, J. (2015). Genome-wide analysis of attention deficit hyperactivity disorder in Norway. *PLoS One*, 10 (4), e0122501.
- Zehle, S., Bock, J., Jezierski, G., Gruss, M. i Braun, K. (2007). Methylphenidate treatment recovers stress-induced elevated dendritic spine densities in the rodent dorsal anterior cingulate cortex. *Dev Neurobiol*, 67 (14), 1891-1900.
- Zeni, C. P., Guimarães, A. P., Polanczyk, G. V., Genro, J. P., Roman, T., Hutz, M. H. i Rohde, L. A. (2007). No significant association between response to methylphenidate and genes of the dopaminergic and serotonergic systems in a sample of Brazilian children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 144B (3), 391-394.
- Zhou, K., Dempfle, A., Arcos-Burgos, M., Bakker, S. C., Banaschewski, T., Biederman, J., ... Asherson, P. (2008). Meta-analysis of genome-wide linkage scans of attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 147B (8), 1392-1398.
- Zhu, H. J., Patrick, K. S., Yuan, H. J., Wang, J. S., Donovan, J. L., DeVane, C. L., ... Markowitz, J. S. (2008). Two CES1 gene mutations lead to dysfunctional carboxylesterase 1 activity in man: clinical significance and molecular basis. *Am J Hum Genet*, 82 (6), 1241-1248.
- Zondervan, K. T. i Cardon, L. R. (2007). Designing candidate gene and genome-wide case-control association studies. *Nat Protoc*, 2 (10), 2492-2501.
- Zylbersztein, K. i Galli, T. (2011). Vesicular traffic in cell navigation. *FEBS J*, 278 (23), 4497-4505.

