

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**A liberação de neurotransmissores e o Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade:
evidências de associação do complexo SNARE com fenótipos externalizantes**

RENATA BASSO CUPERTINO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Claiton Henrique Dotto Bau

Co-orientadora: Dra. Nina Roth Mota

Porto Alegre

2015

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Humana Molecular do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A aluna recebeu bolsa de estudos concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Instituições Financiadoras:

CNPq

CAPES

FAPERGS-DECIT-PPSUS

Agradecimentos

Parto do princípio que o crescimento nunca se dá sozinho, e nesse contexto sou muito grata a todos que estiveram nessa caminhada comigo, nos percalços e nas conquistas. Primeiramente, gostaria de agradecer ao **Claiton**, meu orientador que se mostrou sempre disponível e pronto a ajudar no que fosse necessário, acalmandos os ânimos quando necessário, mas também incitando a ir sempre mais além.

À minha super co-orientadora **Nina**, que foi companheira de todas as horas, nos momentos de desespero e aflição, nas boas horas de descontração sempre acompanhadas de muita risada. Foram diversas caronas, horas trabalhando, intermináveis conversas, que contribuíram enormemente para esse trabalho e para o meu crescimento durante o mestrado.

À **Bruna**, que esteve sempre ali, seja para ajudar com os trabalhos, para relaxar ou para me fazer voltar à academia! Foi uma grande amizade que tive a sorte de encontrar durante essa trajetória. À **Jaque**, outra grande amiga com que pude contar sempre; ouvindo, encorajando, apoiando.

Esse ano nosso laboratório teve um grande ganho, nossa nova IC. À **Cibele** que me ajudou sempre que precisei, indo sempre além do que era pedido e se destacando pelo empenho e amizade. Sempre empolgando a todos com sua super animação!

À toda a matilha! **Djenifer, Diana, Diego, Cris, Alana e Angelita** vocês sempre foram demais e cada um desse grupo o torna especial. Acho que tenho muita sorte de estar rodeada de pessoas maravilhosas. Todos juntos pulando pela janela da oportunidade! Agradeço também aos que não estão mais no laboratório, em especial ao **Guilherme**, que me recebeu no grupo, ainda quando IC.

À todos os clínicos (psiquiatras e psicólogas), que mesmo por vezes mais distantes sempre acrescentam importantes contribuições a todos os trabalhos, apresentando diferentes pontos de vista. E que tem a grande responsabilidade, muitas vezes não reconhecida, das entrevistas frente aos pacientes.

À amigas que não foram loucas o suficiente para se meter na genética, **Narielle, Lu, Ju, Mari e Vit**, mas que estavam do meu lado em diferentes momentos e renderam muitas risadas.

Agradeço à meus pais, **Che e Kátia**, que sempre me apoiaram e se hoje estou aqui é porque eles me proporcionaram isso. Aos meus irmãos, **Júlia e Pedro**, que apesar de todas as

implicâncias eu sei que sempre posso contar. Não poderia deixar de agradecer também ao meu companheiro canino, o Haxi, que me recebe com alegria todos os dias aos voltar para casa, que está sempre que possível ao meu lado, que me convenceu a deixar o trabalho de lado e ir dar uma volta no parcão.

Certamente tenho muita sorte de ter essas pessoas na minha vida que contribuem de diversas formas para o meu desenvolvimento pessoal e profissional. Pessoas que sempre acreditaram em mim, mesmo quando nem eu acreditava. Pessoas que fizeram a diferença e que espero ter ao meu lado pelos próximos anos.

O MEU MUITO OBRIGADA A TODOS, VOCÊS SÃO INCRIVEÍIS!!!

Sumário

Lista de Abreviaturas.....	6
Resumo.....	7
Abstract.....	8
<i>Capítulo I</i>	9
1. Introdução Geral.....	9
1.1 Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade.....	10
1.1.1 Heterogeneidade clínica.....	11
1.1.2 Genética do TDAH.....	14
1.2 Neurotransmissão e o Complexo SNARE.....	15
1.2.1 SNAP-25.....	17
1.2.2 Sintaxina 1A.....	20
1.2.3 VAMP2.....	21
1.2.4 Sinaptotagmina 1.....	22
<i>Capítulo II</i>	24
2. Justificativa e Objetivos.....	24
2.1 Justificativa.....	25
2.2 Objetivo Geral.....	25
2.3 Objetivos Específicos.....	26
<i>Capítulo III</i>	27
3. Artigo: Synaptotagmin (<i>SYT1</i>) effects go beyond diagnostic boundaries: ADHD and other externalizing phenotypes.....	27
<i>Capítulo IV</i>	49
4. Discussão Geral.....	49
5. Referências Bibliográficas.....	53
6. Anexos.....	68
Produção científica durante o mestrado.....	68
Aprovação do comitê de ética do HCPA.....	70

Lista de Abreviaturas

- DAT – Transportador de Dopamina
- DRD4 – Receptor de Dopamina do tipo 4
- DRD5 – Receptor de Dopamina do tipo 5
- DSM – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
- GWAS - Estudo de Associação por Varredura Genômica
- IMpACT - *International Multi-centre persistent ADHD CollaboraTion*
- MPH - Metilfenidato
- NSF - *N-ethylmaleimide-Sensitive Fusion*
- RDoC - *Research Domain Criteria Initiative*
- SM - *Sec1/Munc18-like*
- SNAP – Proteína Solúvel Associada ao NSF
- SNAP-25 - *Synaptosomal Associated Protein 25*
- SNARE - *Soluble NSF-Attachment Protein Receptors*
- SNP - Polimorfismo de Nucleotídeo Único
- STX1A - Sintaxina 1A
- SYT1 - Sinaptotagmina 1
- TC – Transtorno da Conduta
- TDAH - Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade
- TDM - Transtorno Depressivo Maior
- TOD – Transtorno de Oposição Desafiante
- TPAS – Transtorno da Personalidade Antissocial
- TUS – Transtorno por Uso de Substâncias
- VAMP – *Vesicle Associated Membrane Protein*

Resumo

O sistema de neurotransmissão está envolvido na maioria dos transtornos psiquiátricos e por isso tem sido alvo de muitos estudos genéticos. Genes de receptores e transportadores de neurotransmissores, principalmente do sistema dopaminérgico e serotoninérgico, estão entre os mais estudados; no entanto genes envolvidos com a liberação de tais neurotransmissores também podem estar contribuindo na etiologia desses transtornos. O Complexo SNARE possui um papel central na liberação de neurotransmissores e dessa forma é possível o seu envolvimento no desenvolvimento de transtornos psiquiátricos. Sendo o Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) um dos transtornos mais comuns, causando prejuízo a milhares indivíduos e a sociedade, esse estudo avaliou o efeito de variantes genéticas do Complexo SNARE sobre o TDAH. Foram avaliadas seis variantes nos principais componentes formadores do complexo: *Synaptosomal-Associated Protein 25* (SNAP25), Sintaxina 1A (STX1A), *Vesicle-Associated Membrane Protein 2* (VAMP2/sinaptobrevina) e Sinaptotagmina 1 (SYT1) (SNAP25-rs8636; SNAP25-rs6108461; STX1A-rs2228607; VAMP2-indel26pb; SYT1-rs1880867; SYT1-rs2251214). Encontramos uma associação entre a presença do genótipo GG do SYT1-rs2251214 e o TDAH. Uma exploração mais profunda dessa variante revelou um efeito significativo sobre a idade de início da manifestação dos sintomas, onde o genótipo que confere risco para TDAH (GG) está associado a um início de sintomas mais precoce. Esse genótipo se mostrou ainda associado a diferentes fenótipos externalizantes e comorbidades, o que corrobora com a hipótese de que transtornos externalizantes possuem fatores genéticos em comum. Em suma, o presente estudo destaca a importância da heterogeneidade clínica em estudos genéticos e demonstra um efeito da sinaptotagmina sobre diversos fenótipos externalizantes, reforçando a ideia dos transtornos externalizantes compartilharem fatores genéticos de risco.

Abstract

The neurotransmitter system is involved in most psychiatric disorders and therefore has been the focus of several genetic studies. Genes encoding neurotransmitter receptors and transporters, mainly regarding the dopamine and serotonin system, are the most studied; however genes involved in the release of such neurotransmitters may also be contributing to the etiology of these disorders. The SNARE complex has a central role in the release of neurotransmitters. Given that Attention Deficit Disorder/Hyperactivity Disorder (ADHD) is one of the most common disorders, causing injury to individuals and society, this study evaluated the effect of gene variants of the SNARE complex on ADHD and related genotypes. We evaluated six variants in the main components forming the SNARE complex: Synaptosomal-Associated Protein 25 (SNAP25; rs8636; rs6108461), Syntaxin 1A (STX1A; rs2228607) Vesicle-Associated Membrane Protein 2 (VAMP2/synaptobrevin; indel26pb) and synaptotagmin 1 (SYT1; rs1880867; rs2251214). We found an association of *SYT1*-rs2251214 with susceptibility to ADHD. Further exploration of this variant showed a significant effect on the age of onset of symptoms, in which the genotype that confers risk for ADHD (GG) is associated with early onset of symptoms. Moreover, this genotype was associated with different externalizing phenotypes and comorbidities. Overall, this study highlights the importance of clinical heterogeneity in genetic studies and demonstrates an effect of Synaptotagmin on various externalizing phenotypes, reinforces the idea that externalizing disorders share common genetic risk factors.

Capítulo I

1. Introdução Geral

1.1 Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade

O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) é um dos diagnósticos psiquiátricos mais comuns, caracterizado por sintomas de desatenção e/ou agitação psicomotora e impulsividade, e acarreta prejuízos em diversos âmbitos da vida do indivíduo e seus familiares (APA 2013). Por muito tempo o TDAH foi considerado um transtorno exclusivo da infância, com remissão dos sintomas após a completa maturação neuronal; no entanto, posteriormente observou-se que em muitos casos os sintomas podem também estar presentes também na vida adulta (Faraone et al. 2006). O TDAH possui uma prevalência em torno de 5% em crianças e adolescentes (Polanczyk et al. 2014) e de 2,5-4,4% em adultos (Kessler et al. 2006; Simon et al. 2009).

O diagnóstico é mais comumente realizado com base no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM) proposto pela Associação Americana de Psiquiatria, recentemente publicado sua quinta edição (DSM-5 - APA 2013). Para preencher os critérios diagnósticos de TDAH, os sintomas devem ser inconsistentes com o estágio de desenvolvimento, acarretando prejuízo na vida do indivíduo em pelo menos dois contextos sociais e por no mínimo 6 meses (APA 2013). De acordo com os sintomas apresentados, os pacientes são classificados em três subtipos: predominantemente desatento, predominantemente hiperativo/impulsivo ou combinado. Os sintomas devem iniciar ainda na infância, antes dos 12 anos, de acordo com o DSM-5 (APA 2013), embora esse critério ainda seja alvo de discussões. No caso dos pacientes que buscam ajuda já na vida adulta, esse critério diagnóstico exige uma acurada recordação dos sintomas, envolvendo um viés de memória e podendo assim levar ao subdiagnóstico (Kieling et al. 2010; Breda et al. 2015). Um estudo publicado esse ano demonstrou o início dos sintomas também após os 12 anos (Moffitt et al. 2015), sugerindo a possibilidade de um grupo distinto de pacientes com TDAH, quanto a sua etiologia e neurobiologia.

O tratamento farmacológico do TDAH é realizado principalmente com o uso de estimulantes do Sistema Nervoso Central, sendo o metilfenidato (MPH) o fármaco de primeira escolha. A eficácia fármaco-terapêutica na redução dos sintomas é estimada em 65-75% em crianças, adolescentes e adultos (Kooij et al. 2008; Wigal 2009; Kaplan & Newcorn 2011;

Castells et al. 2011). Embora o mecanismo de ação do MPH ainda não seja inteiramente compreendido, sabe-se que, ao menos em parte, seu efeito é atribuível a modulação da neurotransmissão dopaminérgica e noradrenérgica, através do bloqueio de transportadores de dopamina e noradrenalina (Sulzer et al. 2005).

1.1.1 Heterogeneidade clínica

O TDAH, assim como outros transtornos psiquiátricos, possui uma etiologia complexa, onde fatores genéticos e ambientais estão envolvidos na sua manifestação. A confluência desses diferentes fatores confere uma ampla heterogeneidade clínica entre os indivíduos afetados. Isto se dá tanto em relação à apresentação de sintomas (de desatenção, hiperatividade/impulsividade e/ou ambos) quanto à presença de comorbidades, tornando ainda mais complexa a identificação de fatores envolvidos em sua susceptibilidade e resposta terapêutica.

Indivíduos com TDAH frequentemente apresentam outros transtornos psiquiátricos, o que leva a um quadro clínico de maior prejuízo, pior prognóstico e dificuldade no tratamento (Sobanski 2006; Fatseas et al. 2012). Entre as principais comorbidades observadas estão o Transtorno de Oposição Desafiante (TOD), Transtorno da Conduta (TC), Transtorno da Personalidade Antissocial (TPAS), Transtorno Bipolar, Transtorno Depressivo Maior (TDM), Transtorno de Ansiedade Generalizada e Transtorno por Uso de Substâncias (TUS) (Gillberg et al. 2004; Sobanski 2006; Biederman 2005).

Os transtornos psiquiátricos podem ser classificados como externalizantes ou internalizantes, conceito desenvolvido primeiramente por Achenbach (Achenbach 1966) e utilizado até hoje (Beesdo-Baum et al. 2009; Carvalho et al. 2013). Comportamentos externalizantes são aqueles com manifestação mais voltada para o ambiente externo, como os comportamentos disruptivos, hiperativos e agressivos (Eisenberg et al. 2001; Liu 2004). Já os internalizantes são aqueles onde o indivíduo mantém seu sofrimento internamente, como sintomas de depressão e ansiedade e estresse pós-traumático, além da dimensão de personalidade ‘neuroticismo’ (Eisenberg et al. 2001; Griffith et al. 2010). O TDAH apresenta tanto características externalizantes quanto internalizantes (Jacob et al. 2014), embora

indivíduos com apresentação predominantemente hiperativa/impulsiva possam ser mais associados com fenótipos externalizantes (Liu 2004; Jacob et al. 2014).

Além da variabilidade de sintomas apresentados e sua gravidade, outra fonte de heterogeneidade observada dentre os indivíduos com TDAH é a idade de início dos sintomas. Inclusive, a edição anterior do DSM (DSM-IV- APA 1994) estabelecia como critério diagnóstico a manifestação dos sintomas até os 7 anos; entretanto, na edição mais atual, essa idade foi alterada com base em observações de que indivíduos com idade de início dos sintomas de TDAH antes dos 7 anos não eram clinicamente distintos daqueles com início entre 7-12 anos, apesar de apresentarem algumas poucas diferenças na sua manifestação (Karam et al. 2009; Polanczyk et al. 2010). Dentre estas, a manifestação mais precoce dos sintomas (< 7 anos) está associada a um maior número de sintomas de hiperatividade (Karam et al. 2009; Lin et al. 2015), mais transtornos externalizantes (Connor et al. 2003), menos Transtorno de Ansiedade Generalizada (Karam et al. 2009), mais problemas com autoridade e disciplina (Karam et al. 2009) e maiores escores da dimensão de personalidade ‘busca por novidades’ (Guimarães-da-Silva et al. 2012) comparado com aqueles com início mais tardio (entre 7 e 12 anos). Ainda que não se tenha uma relação de causa-consequência, tais observações podem indicar fatores genéticos e/ou ambientais comuns entre esses fenótipos.

1.1.1.1 Comorbidades e outros fenótipos externalizantes no TDAH

Como mencionado anteriormente, o TDAH frequentemente se apresenta acompanhado por outros transtornos psiquiátricos. Aproximadamente 60% das crianças com TDAH possuem alguma comorbidade, sendo os transtornos externalizantes os mais comuns (42-90% comparado com 13-51% de internalizantes) (Jensen et al. 1997; Gillberg et al. 2004). Da mesma forma, 65-89% dos adultos com TDAH apresentam alguma comorbidade (Sobanski 2006). Essa alta taxa de comorbidades pode dificultar o diagnóstico, principalmente nos adultos, quando há a necessidade de distingui-los de sintomas de outros transtornos (Barkley & Brown 2008). Notavelmente, enquanto na população geral o TDAH ocorre em 2.5-4.4%, dos adultos, em pacientes com algum tipo de TUS a prevalência é de 25-35%; o inverso também ocorre, visto que mais de 50% dos indivíduos com TDAH sofrem com algum tipo de TUS (revisado por

Sobanski 2006). Além de um maior risco ao uso de substâncias, os indivíduos com TDAH tendem a iniciar o uso mais precocemente e a desenvolver dependência (Sobanski 2006).

Indivíduos com TDAH também frequentemente manifestam TOD ou TC em algum momento da vida (40-60% e 20-30%, respectivamente) (Connor et al. 2003; Faraone et al. 2005; Frick 2009). A presença destes transtornos em comorbidade com o TDAH está associada a um pior prognóstico tanto em crianças (Kim-Cohen et al. 2003; Biederman et al. 2008; Copeland et al. 2009; Young et al. 2009; Noordermeer et al. 2015) quanto em adultos (Harpold et al. 2007; Ebejer et al. 2012; Vitola et al. 2012). O TOD se caracteriza pelo humor irritável, comportamento questionador/desafiante ou índole vingativa, geralmente com início na infância e frequentemente precedendo o desenvolvimento do TC (APA 2013). O TC, por sua vez, é definido como um padrão de comportamento repetitivo e persistente no qual os direitos básicos de outras pessoas ou normas são violados (APA 2013).

O TPAS se caracteriza por um padrão difuso de desconsideração e violação dos direitos de outras pessoas (APA 2013). O TPAS na vida adulta é associado a histórico prévio de TOD e TC (Kim-Cohen et al. 2003). Adultos com TDAH em comorbidade com TPAS ou histórico de TC parecem representar um subtipo mais grave de TDAH e com um componente genético mais evidente (Thapar et al. 2001). Uma meta-análise com dados de GWAS de TDAH apoiou esse achado mostrando que crianças com TC associado apresentavam escores mais altos de risco poligênico (Hamshere et al. 2013).

Além das comorbidades, os sintomas do TDAH também estão associados a comportamentos externalizantes, muitas vezes relacionados a desfechos negativos. Por exemplo, sintomas de impulsividade, relacionados a déficits na inibição de resposta e tomada de decisões, frequentemente levam a problemas psicossociais e comportamentos inapropriados (Liu 2004; Matthies et al. 2012; Robbins et al. 2012). Comportamentos disruptivos, de hiperatividade e agressividade são exemplos de comportamentos externalizantes observados em uma parcela dos indivíduos com TDAH que podem implicar em um alto risco de criminalidade e assumir riscos desnecessários na condução de veículos e relações sexuais (Flory et al. 2006; Biederman et al. 2012). Além disso, condutas externalizantes são relacionadas com prejuízos educacionais (Soendergaard et al. 2015).

Crianças com TDAH frequentemente enfrentam problemas educacionais e um baixo desempenho escolar, resultando em déficits acadêmicos; além disso, elas são expulsas, suspensas ou repetem de ano mais frequentemente do que crianças sem TDAH (Loe & Feldman 2007; Diaz et al. 2015; Soendergaard et al. 2015). Essas consequências negativas podem persistir durante a vida toda (Loe & Feldman 2007); visto que adultos com TDAH frequentemente têm maior dificuldade para se manter em um emprego e têm sua carteira de habilitação suspensa mais vezes, além de problemas educacionais (Murphy & Barkley 1996; Jacob et al. 2014; Soendergaard et al. 2015).

1.1.2 Genética do TDAH

Estudos genéticos do TDAH começaram com a observação de que indivíduos hiperativos tendem a se agregar em famílias (Morrison & Stewart 1971; Cantwell 1972). A partir de estudos com gêmeos, observou-se uma alta herdabilidade dos sintomas relacionados ao TDAH, estimada em 70-80% tanto em crianças quanto em adultos (Faraone et al. 2005; Chang et al. 2013). Estudos de associação através da análise de genes candidatos e por varredura genômica (GWAS - *Genome Wide Association Study*) vêm buscando identificar fatores genéticos específicos que contribuam para o desenvolvimento deste transtorno (Franke et al. 2009; Hawi et al. 2015).

A maior parte dos estudos com genes candidatos no TDAH envolve polimorfismos em genes relacionados à neurotransmissão, particularmente aqueles do sistema dopaminérgico ou serotoninérgico (Franke et al 2011). Destaque especial pode ser dado para o papel dos genes do transportador de dopamina (*DAT1/SLC6A3*) e do receptor de dopamina do tipo 4 (*DRD4*) e do tipo 5 (*DRD5*), para os quais há evidências de associação apoiadas em resultados de meta-análise com amostras de crianças (Gizer et al. 2009). Entretanto, os resultados a respeito dos demais genes investigados, bem como da influência dos genes citados acima em amostras de adultos, são contraditórios ou inconclusivos (Franke et al. 2011).

Os GWAS buscam sugerir novas rotas ou genes a serem investigados, uma vez que não se baseiam em genes candidatos *a priori*; no entanto, essa abordagem apresenta como principais limitações o grande tamanho amostral necessário devido ao limiar de significância exigido pelos múltiplos testes ($p < 5 \times 10^{-8}$) e o pequeno tamanho de efeito esperado das variantes

genéticas envolvidas em transtornos psiquiátricos. Os GWAS de TDAH publicados até o momento não encontraram nenhum *loci* significativamente associados (Lasky-Su et al. 2008; Lesch et al. 2008; Neale et al. 2008; Mick et al. 2010; Neale et al. 2010; Hinney et al. 2011; Stergiakouli et al. 2012; Zayats et al. 2015). Por esse motivo, os estudos com hipóteses baseadas em mecanismos fisiopatológicos envolvidos no transtorno permanecem como um modelo válido para as pesquisas.

1.2 Neurotransmissão e o Complexo SNARE

A principal forma de transmissão de informação entre neurônios ocorre através da ação de neurotransmissores nas sinapses, regiões de contato especializadas entre os neurônios. Os neurotransmissores (incluindo as monoaminas, as catecolaminas, peptídeos e outros) são essenciais no funcionamento do sistema nervoso. Em organismos com sistema nervoso mais complexo, eles atuam na rápida e eficiente comunicação entre os neurônios, sendo indispensáveis para o bom funcionamento cognitivo e executivo. Estas moléculas são sintetizadas no citosol e armazenadas em diversas vesículas na membrana pré-sináptica (Bear et al. 2007). A liberação dos neurotransmissores envolve a chegada de um potencial de ação no axônio terminal, despolarizando a membrana e levando à abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem. A fusão da vesícula sináptica na membrana plasmática, e consequente liberação de seus neurotransmissores na fenda, depende de uma alta concentração de cálcio gerada por esse influxo.

O conjunto de proteínas conhecido como Complexo SNARE (*Soluble NSF-Attachment Protein Receptors*), da qual fazem parte as proteínas sinaptobrevina/VAMP (*Vesicle Associated Membrane Protein*), syntaxina e SNAP-25 (*Synaptosome-Associated Protein of relative molecular mass 25kDa*) é essencial para o acoplamento da vesícula à membrana plasmática (Südhof 1995; Südhof 2013). A formação do complexo SNARE se inicia com a instauração do heterodímero syntaxina-SNAP-25 na membrana alvo (t-SNARE). Em seguida, a sinaptobrevina, presente na membrana vesicular (v-SNARE), liga-se ao heterodímero formando o complexo SNARE (Hamilton & Armando 2008; Südhof 2013). Esse processo é ilustrado na **figura 1**.

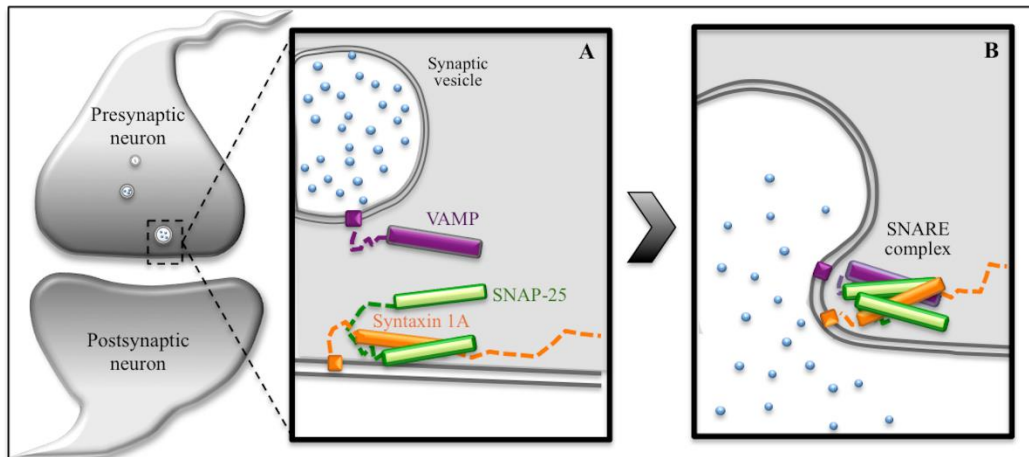


Figura 1. Montagem do complexo SNARE no terminal pré-sináptico permitindo a liberação de neurotransmissores. A. Montagem inicial das principais proteínas formadoras do complexo SNARE; o SNAP-25 (verde) citoplasmático forma um heterodímero com a Sintaxina 1A (laranja) pela ligação dos domínios SNARE (retângulos). A seguir, a VAMP (1 ou 2) se liga ao segundo domínio SNARE do SNAP-25 no heterodímero. Os quadrados representam os domínios transmembrana na membrana plasmática e vesicular da Sintaxina 1A e da VAMP, respectivamente. B. O complexo SNARE completamente formado, aproximando as membranas plasmática e vesicular e permitindo a exocitose de neurotransmissores. Fonte: Cupertino et al 2015 - em preparação.

As complexinas estabilizam o complexo e interrompem a aproximação das membranas, se ligando à membrana na região próxima à sintaxina 1A/SNAP-25. Além disso, a proteína citosólica SM (*Sec1/Munc18-like*) Munc 18-1 se liga ao complexo t-SNARE e à VAMP2, favorecendo a formação do complexo (Bharat et al, 2014).

Outra proteína envolvida na neurotransmissão dependente de cálcio é a proteína vesicular transmembrana sinaptotagmina, a qual atua como um sensor de cálcio e dessa forma é crucial para a liberação de neurotransmissores de forma adequada (Geppert et al. 1994). Quando ocorre o influxo de cálcio, a sinaptotagmina se liga a fosfolipídios e ao t-SNARE, desestabilizando a bicamada lipídica da membrana plasmática e liberando a complexina, e dessa forma, desencadeia a fusão das membranas (Bharat et al. 2014).

Após a fusão da vesícula à membrana plasmática, o complexo SNARE recruta uma proteína SNAP (*Soluble NSF-Associated Protein*), que permite a ligação da NSF (*N-ethylmaleimide-Sensitive Fusion*) ao complexo. A NSF possui função de ATPase e, através da hidrólise de ATP, provoca a dissociação das proteínas do complexo SNARE (Söllner et al. 1993; Südhof 2013), que ficam livres para serem utilizadas na formação de um novo complexo.

1.2.1 SNAP-25

O SNAP-25 é uma proteína hidrofóbica com 206 aminoácidos, a qual é ligada a membrana através de resíduos palmitil (tioester ligado a quatro cisteínas) no centro da proteína. O gene que codifica o SNAP-25 (*SNAP25*) se localiza no cromossomo 20 (20p12-p11.2) e possui 10 éxons. O éxon 5 sofreu um processo de duplicação há 400 milhões de anos (Johansson et al. 2008) gerando o éxon 5a e 5b com apenas nove aminoácidos de diferença; um processo de *splicing* deste éxon 5 origina duas isoformas, 'a' e 'b'. Dentre estes aminoácidos divergentes, quatro são resíduos centrais de cisteína, implicando na ligação em diferentes membranas-alvo (Hodel 1998). A isoforma 'a' (SNAP-25a) é expressa predominantemente na infância e é associada ao desenvolvimento e crescimento axonal, enquanto a isoforma 'b' (SNAP-25b) predomina na vida adulta, estando associada à formação do complexo SNARE e à liberação de neurotransmissores (Bark et al. 1995; Hepp & Langley 2001). Algumas regiões cerebrais com maior plasticidade neuronal (como no bulbo olfatório e no hipocampo, envolvidos com olfação e memória, respectivamente) continuam a expressar a isoforma SNAP-25a mesmo durante a vida adulta (Boschert et al. 1996).

No período de transição entre as isoformas predominantes, entre o 25º e 35º dia em camundongos, foi observado que animais mutantes superexpressando o SNAP-25a, e com limitada expressão de SNAP-25b, não sobrevivem (Bark 2004). Essa observação sugere que o *splicing* alternativo, com conseqüente troca da isoforma, pode contribuir para a consolidação do desenvolvimento neuronal. Ainda não é bem compreendido o que pode estar controlando o *splicing* alternativo e, conseqüentemente, a expressão de cada isoforma; lesões no nervo,

indução de potencial de longa duração, fatores neurotróficos e agentes neurotóxicos parecem influenciar na expressão da isoforma SNAP-25a (Boschert et al. 1996; Hepp et al. 2001).

Estudos com modelo animal forneceram as primeiras evidências a respeito do envolvimento do *SNAP25* em fenótipos comportamentais relacionados ao TDAH. Foi observado que uma deleção de uma região do cromossomo 2 (1-2 cM), a qual inclui todo o gene *SNAP25*, originava uma cepa de camundongos mutantes, que foi denominada *coloboma* (Hess et al. 1992). Os homozigotos para essa deleção não sobrevivem ao período embrionário e os hemizigotos apresentam malformações oculares, *head bobbing* e hiperatividade, além de uma atividade noturna aumentada e surtos ocasionais de agitação durante o dia após a alimentação. Os *coloboma* apresentam uma redução de 50% na expressão de SNAP-25 de maneira uniforme em todos os tecidos onde ele é expresso (Hess et al. 1992). Além disso, esses camundongos mutantes também apresentam menor massa corporal e alterações em marcos do desenvolvimento neurocomportamental, como reflexo de endireitamento e *bar holding task* (Heyser et al. 1995). Jones e colaboradores demonstraram ainda alterações neuroquímicas de catecolaminas nos *coloboma*, ocorrendo uma diminuição de metabólitos da dopamina e aumento na concentração de noradrenalina no núcleo *accumbens* e no estriado. Essa regulação diferencial das catecolaminas região-específica nos núcleos da base é coerente com a hiperatividade observada, visto que ambas as regiões estão envolvidas, entre outras funções, com o controle de atividade motora (Jones et al. 2001).

A administração de baixas doses de dextroanfetamina nos *coloboma* adultos (8-10 semanas) é capaz de normalizar a atividade locomotora sem induzir comportamentos estereotipados, no entanto o metilfenidato não consegue esse mesmo resultado, aumentando a hiperatividade de maneira dose-dependente tanto em camundongos mutantes (*coloboma*) quanto selvagens (Hess et al. 1996). O principal mecanismo de ação de ambos os fármacos se dá através do bloqueio de transportadores de dopamina e noradrenalina, propiciando maior disponibilidade desses neurotransmissores na fenda sináptica. Entretanto, estes fármacos diferem no mecanismo pré-sináptico, uma vez que a dextroanfetamina, além de aumentar a ação das catecolaminas, também induz a um aumento na sua liberação (Scheel-Krüger 1971; Sulzer et al. 1995). Além disso, a inserção de um transgene do *SNAP25b* nos camundongos *coloboma* adultos também é capaz de levar à reversão parcial dos sintomas de hiperatividade. No entanto,

a expressão da proteína não é completamente normalizada, apresentando taxas distintas de recuperação da expressão em diferentes regiões; por exemplo, no estriado e cerebelo, regiões envolvidas com controle motor, há a restauração de 80% dos níveis proteicos normais, enquanto no córtex esses níveis praticamente não aumentam (Hess et al. 1996). Visto que o transgene de cDNA do *SNAP25b* foi capaz de reduzir os sintomas de hiperatividade, sugere-se que esse comportamento se deva à falta dessa isoforma (SNAP-25b), e não a anormalidades durante o desenvolvimento associadas com a redução do SNAP-25a (Hess et al. 1996).

Há também evidências de que mutações no *SNAP25* podem alterar os níveis de expressão e/ou funcionalidade da proteína e, conseqüentemente, afetar a liberação de neurotransmissores (Brophy et al. 2002). Dessa forma, os achados provenientes de estudos com modelo animal (*coloboma*) apontam o SNAP25 como um gene possivelmente envolvido na etiologia do TDAH. O efeito de diversos polimorfismos nesse gene já foi investigado em relação ao transtorno. Enquanto alguns demonstraram um efeito significativo destes no TDAH (Barr et al. 2000; Mill et al. 2002; Mill et al. 2004; Feng et al. 2005; Mill et al. 2005; Guan et al. 2009; Zhang et al. 2011; Sarkar et al. 2012; Hawi et al. 2013; Gálvez et al. 2014), outros não replicaram tais associações (Kustanovich et al. 2003; Brookes et al. 2005; Brookes et al. 2006; Renner et al. 2008; Sánchez-Mora et al. 2013; Gao et al. 2015). Meta-análises incluindo 7 estudos (Forero et al. 2009; Gizer et al. 2009) demonstraram uma associação significativa do SNP rs3746544 do *SNAP25* com o TDAH em crianças. Além disso, através de análises computacionais, Chang et al. (2012) apontaram 16 genes, entre eles o *SNAP25*, como fortes candidatos para a susceptibilidade ao TDAH. Além disso, o *SNAP25* também já foi estudado em relação a outros fenótipos psiquiátricos, como esquizofrenia e epilepsia, com resultados contraditórios (Corradini et al. 2009).

Um dos SNPs abordados nesse trabalho de mestrado foi o rs8636, localizado na região 3'UTR do gene, o qual está em desequilíbrio de ligação com o SNP mais estudado (rs3746544), esse último com resultado positivo nas duas meta-análises mencionadas anteriormente. Além disso, o rs8636 já foi associado à susceptibilidade ao TDAH em crianças (Sarkar et al. 2012) e à esquizofrenia (Carroll et al. 2009); entretanto, outros autores não replicaram esses resultados (Fanous et al. 2010; Sánchez-Mora et al. 2013; Hawi et al. 2013; Gao et al. 2015). O rs6108461 (intrônico) também foi analisado devido a evidência de um papel funcional, no qual este SNP

parece alterar a expressão do mRNA do gene *SNAP25* de forma dose-dependente (Hawi et al. 2013). Esse SNP também foi associado à susceptibilidade ao TDAH em crianças (Guan et al. 2009), mas não replicado (Sánchez-Mora et al. 2013; Hawi et al. 2013).

1.2.2 Sintaxina 1A

A proteína sintaxina 1A (STX1A), expressa pré-sinápticamente na membrana plasmática, é envolvida na liberação de neurotransmissores e no acoplamento da vesícula sináptica tanto como homodímero quanto como heterodímero, por meio de sua participação na formação do complexo SNARE (processo descrito anteriormente). Além disso, foi demonstrado que a sintaxina 1A é capaz de modificar as propriedades cinéticas dos canais de cálcio dependentes de voltagem. Dessa forma, ela possui um papel fundamental na abertura dos canais de cálcio e na regulação do processo de neurotransmissão (Wiser et al. 1996; Trus et al. 2001). Essa propriedade depende de dois resíduos de cisteína em sua cauda transmembrana C-terminal que parecem interagir diretamente com canais de cálcio (Arien et al. 2003). A sintaxina 1A também interage com os transportadores de dopamina, serotonina e noradrenalina (os quais estão possivelmente envolvidos na etiologia do TDAH), regulando sua localização subcelular e expressão (Haase et al. 2001; Lee et al. 2004; Quick 2006; Dipace et al. 2007; Binda et al. 2008).

O gene que codifica a sintaxina 1A (*STX1A*) é localizado no cromossomo 7 (7q11.23). Análises computacionais (Chang et al. 2012) e resultados nominais de GWAS (Neale et al. 2008) apontaram o gene *STX1A* como um bom candidato para estudos de associação com TDAH. No entanto, poucos estudos abordaram o papel do *STX1A* no TDAH e a maioria dos estudos até o momento foram realizados com crianças e obtiveram resultados negativos (Brookes et al. 2005; Brookes et al. 2006; Guan et al. 2009; Sánchez-Mora et al. 2013). Apenas um resultado com crianças observou um efeito significativo desse gene sobre a susceptibilidade ao TDAH (Gao et al. 2015). Em contrapartida, todos os estudos realizados com adultos reportaram associação de pelo menos um SNP no *STX1A* com TDAH (Sánchez-Mora et al. 2013; Kenar et al. 2014; Olgiati et al. 2014). Essa diferença de achados entre crianças e adultos pode indicar a existência de fatores idade-específicos (Sánchez-Mora et al. 2013), refletindo o

importante papel dos genes do complexo SNARE no desenvolvimento. Variantes no gene *STX1A* também já foram associadas a Transtornos do Espectro Autista (Nakamura et al. 2008; Durdiaková et al. 2014; Nakamura et al. 2011; Malenfant et al. 2012; Tordjman et al. 2013; Roberts et al. 2014) e Esquizofrenia (Wong et al. 2004; Kawashima et al. 2008; Mulle et al. 2014).

O rs2228607, associado com a susceptibilidade ao TDAH em adultos (Sánchez-Mora et al. 2013) e autismo de alto funcionamento (Nakamura et al. 2011), tem um efeito funcional relevante, no qual o alelo C afeta o processo de *splicing*, favorecendo a inclusão do intron 3 e assim gerando um mRNA instável, mais sujeito a degradação por *nonsense-mediated mRNA decay* (von Kanel et al. 2013). Por esse motivo, esse SNP foi escolhido no presente estudo.

1.2.3 VAMP2

Dois membros da família VAMP estão envolvidos na liberação de neurotransmissores (VAMP1 e VAMP2, conhecidas como sinaptobrevinas), ambos estruturalmente semelhantes. Este trabalho contemplou apenas a VAMP2 em virtude de um maior corpo de evidências apontando para o seu papel em transtornos psiquiátricos desse membro da família, do que em relação à VAMP1. Além disso, as expressões das duas proteínas apresentam diferentes padrões em cérebros maduros de ratos; enquanto a Vamp2 é mais amplamente expressa e mais abundante na maior parte das regiões cerebrais, a Vamp-1 predomina em algumas áreas específicas (Raptis et al. 2005). Esse padrão diferente pode indicar que elas exerçam funções distintas; o que está de acordo com o demonstrado papel crucial da Vamp2 na liberação de neurotransmissores em estágios iniciais do desenvolvimento cerebral, não substituível pela Vamp1 (Schoch et al. 2001).

Além do seu envolvimento na liberação de neurotransmissores, descrito anteriormente, a VAMP2 parece promover a alongação dos neuritos (Shirasu et al. 2000; Kimura et al. 2003). Nos últimos anos a importância das células gliais tem se mostrado cada vez mais evidente, estando inclusive implicadas com transtornos psiquiátricos. Nesse contexto, a VAMP2 também se destaca, já que os gliotransmissores liberados pelos astrócitos, células gliais mais abundantes no cérebro, são estocados em vesículas contendo VAMP2 (*VAMP-2-containing vesicles*)

(Araque et al. 2000; Zhang et al. 2004; Mothet et al. 2005; Parpura et al. 2010; Parpura & Zorec 2010).

O gene *VAMP2* é localizado no cromossomo 17 (17p13.1) e tem sido estudado em relação a diversos transtornos psiquiátricos. Em relação ao TDAH em crianças, apesar de nenhum estudo ter encontrado efeitos significativos de SNPs nesse gene na susceptibilidade ao transtorno (Brookes et al. 2005; Brookes et al. 2006; Sánchez-Mora et al. 2013), foi observada uma associação com memória de trabalho em crianças com TDAH (Gao et al. 2015). Em amostras de adultos com TDAH apenas duas variantes já foram analisadas em diferentes estudos, tendo uma sido associada (Kenar et al. 2014) e a outra não (Sánchez-Mora et al. 2013). Kenar et al. (2014) explorou um polimorfismo do tipo inserção/deleção de 26pb localizado em um região intergênica próximo ao gene *VAMP2* (Falbo et al. 2002) e encontrou um efeito de risco do alelo *Ins* no TDAH em adultos. O gene *VAMP2* também já foi estudado em relação a outros transtornos psiquiátricos e doenças neurológicas, como esquizofrenia, transtorno de humor bipolar e Doença de Alzheimer (Kawashima et al. 2008; Abou Jamra et al. 2008; Edgünlü et al. 2012).

1.2.4 Sinaptotagmina 1

A sinaptotagmina (SYT) é uma proteína transmembrana localizada na vesícula sináptica, essencial para a regulação adequada da neurotransmissão, visto que atua como um sensor ao influxo de cálcio (Südhof 2013). Existem 16 isoformas conhecidas dessa proteína, sendo a sinaptotagmina I (SYT1) a mais amplamente estudada (Südhof 2002; Mohrmann et al. 2013). Além de facilitar e acelerar o acoplamento da vesícula sináptica à membrana, a sinaptotagmina estabiliza os poros de fusão (Wang et al. 2001), possivelmente alterando a composição ou tensão da membrana (Südhof 2004). A sinaptotagmina 1 também está envolvida no crescimento dos neuritos (Fukuda et al. 2002).

Dessa forma, sabendo da sua importância para o bom funcionamento da neurotransmissão e da sua relação com fatores já relacionados ao TDAH, é plausível que o gene que codifica a sinaptotagmina 1 (*SYT1*) esteja envolvido na etiologia do TDAH. Embora os primeiros estudos

com respeito ao TDAH em crianças não tenham encontrado efeito significativo de nenhum SNP avaliado (Brookes et al. 2005; Brookes et al. 2006), estudos posteriores demonstraram diferentes SNPs associados à susceptibilidade ao TDAH em crianças (Guan et al. 2009; Sánchez-Mora et al. 2013), bem como à idade de início dos sintomas (Lasky-Su 2008). Em relação a adultos com TDAH, apenas um estudo foi conduzido até o momento. Sánchez-Mora et al. (2013) encontrou uma associação de um SNP no gene *SYT1* (rs2251214) associado à susceptibilidade ao TDAH em adultos. Em virtude dessa associação prévia, este SNP foi abordado no presente trabalho, além do rs1880867, o qual parece alterar os níveis de metilação do gene *SYT1* (Zhang et al. 2010).

Capítulo II

2. Justificativa e Objetivos

2.1 Justificativa

Os transtornos psiquiátricos estão entre as principais causas de incapacidade em todo o mundo, podendo ter forte impacto em diversos contextos da vida dos indivíduos afetados e seus familiares. Apesar de possuir uma alta herdabilidade (estimada entre 70 e 80%), a natureza complexa do TDAH tem dificultado a identificação de variantes genéticas específicas envolvidas no seu desenvolvimento.

Diferentes tipos de estudos apontam para o papel central de alterações do sistema de neurotransmissão na etiologia do transtorno. Sendo assim, a análise da influência de polimorfismos em genes que codificam proteínas que atuam na neurotransmissão pode auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do TDAH e na sua heterogeneidade clínica. Os genes de receptores e transportadores de neurotransmissores representam os maiores focos de investigação no TDAH até o momento. No entanto, poucos estudos avaliaram o papel de genes relacionados ao sistema de liberação de tais neurotransmissores, como os genes do complexo SNARE, os quais apresentam um papel central na transmissão sináptica. Tal escassez de estudos é ainda mais pronunciada em adultos, onde os poucos resultados encontrados até o momento mostram-se contraditórios ou inconclusivos. Dessa forma, o estudo de variantes genéticas do complexo SNARE em uma amostra de adultos com TDAH extensamente caracterizada, permitindo a exploração da ampla heterogeneidade clínica, pode contribuir para o entendimento do papel do sistema de liberação de neurotransmissores no transtorno. Além disso, tal compreensão poderia futuramente trazer informações importantes para novas estratégias diagnósticas e terapêuticas.

2.2 Objetivo Geral

Avaliar o papel de polimorfismos nos genes *SNAP25*, *STX1A*, *VAMP2* e *SYT1* do complexo SNARE na susceptibilidade ao TDAH, bem como na modulação de sua manifestação clínica e fenótipos relacionados.

2.3 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito de variantes genéticas do complexo SNARE (*SNAP25*-rs8638, *SNAP25*-rs6108461, *STX1A*-rs2228607, *VAMP2*-indel26pb, *SYT1*-rs2251214 e *SYT1*-rs1880867) sobre a susceptibilidade ao TDAH em adultos;

- Explorar se os efeitos observados do complexo SNARE sobre a susceptibilidade ao TDAH são também capazes de modular sua manifestação clínica, como por exemplo, a gravidade e idade de início dos sintomas;

- Abordar também a heterogeneidade do TDAH testando o papel das variantes associadas na susceptibilidade a características clínicas e transtornos relacionados.

Capítulo III

3. Artículo: Synaptotagmin (*SYT1*) effects go beyond diagnostic boundaries: ADHD and other externalizing phenotypes

A ser submetido na revista: Psychological Medicine
Fator de Impacto: 5.428

Synaptotagmin (*SYTI*) effects go beyond diagnostic boundaries: ADHD and other externalizing phenotypes

Renata Basso Cupertino¹, Cibele Edom Bandeira¹, Bruna Santos da Silva¹, Djenifer B. Kappel¹, Jaqueline Bohrer Schuch¹, Eduardo S. Vitola², Nina Roth Mota¹ and Claiton Henrique Dotto Bau¹

¹ Department of Genetics, Instituto de Biociências, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

² ADHD Outpatient Program—Adult Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author:

Dr. Claiton H. D. Bau

Department of Genetics, Instituto de Biociências, UFRGS,

Avenida Bento Gonçalves, 9500

Porto Alegre, RS, Brazil

CEP: 91501-970

Email: claiton.bau@ufrgs.br

Telephone: (5551) 3308-6718; Fax: (5551) 3308-7311

ABSTRACT

Background: Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) has a high heritability estimate (70-80%) both in children and adults, however studies have had difficulties in identifying the genetic underpinning of its etiology. Subjects with ADHD frequently present impairments in their academic achievement and relation with society. A range of comorbidities are also commonly present, leading to a more complex phenotype. Evidence pointed to an important role of neurotransmission in the neurobiology of ADHD. In this sense, the Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment REceptors (SNARE) complex arise as a system potentially involved in ADHD pathophysiology, since it has a central role on neurotransmitter release. We aim to analyze the effects of polymorphisms on SNARE complex genes (*STX1A* rs2228607, *SYT1* rs2251214 and rs1880867, *VAMP2* indel26pb and *SNAP25* rs8636 and rs6108461) in adults with ADHD. We also intend to explore the clinical heterogeneity among subjects with ADHD. **Methods:** The sample comprised 549 patients with ADHD, diagnosed according to the DSM-IV criteria, and 643 blood donor controls without ADHD. **Results:** We found a significant association between *SYT1*-rs2251214 and adulthood ADHD. The SYT1-rs2251214 SNP was also associated with age at onset of ADHD symptoms and with a range of externalizing phenotypes. **Conclusion:** These finding suggests that SYT1 SNPs may be associated in varying degrees in a spectrum of externalizing behaviors, supporting the view that externalizing disorders might share common genetic factors.

Key-words: SNARE, ADHD, externalizing, synaptotagmin, ASPD

Introduction

Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) is a highly prevalent disorder, occurring in about 5% of children (Polanczyk et al. 2014) and 2.5-5% of adults (Kessler et al. 2006; Simon et al. 2009). The core symptoms are impairing levels of inattention and/or hyperactivity/impulsivity. It has a high heritability estimate (70-80%) both in children and adults (Faraone et al. 2005; Nikolas et al. 2010; Chang et al. 2013; Brikell et al. 2015), however little is known about the genetic variants underpinning ADHD (Franke et al. 2011; Hawi et al. 2015), with several inconclusive results.

Patients with ADHD have high comorbidity rates. Additional psychiatric disorders are observed in 60% of children (Gillberg et al. 2004) and 65-89% of adults (Sobanski 2006) leading to worse prognosis, greater neurophysiological deficits and poorer treatment response (Sobanski 2006). The most frequent comorbidities are Oppositional Defiant Disorder (ODD), Conduct Disorder (CD), Antisocial Personality Disorder (ASPD), Major Depressive Disorder, Bipolar Disorder, Generalized Anxiety Disorder and Substance Use Disorders (Gillberg et al. 2004; Biederman et al. 2006; Sobanski 2006). This high heterogeneity may help to explain the complex findings and the variability in odds ratios observed among genetic association studies of ADHD (Gizer et al., 2009).

Genome-wide association studies (GWAS) have become a main source of potentially implicated systems for further investigations; yet, ADHD GWAS have not been able to identify associated hits. Alternatively, animal models and cell function assays can also provide insights for plausible hypotheses in specific phenotypes. Neurotransmission has a central role in the pathophysiology of all psychiatric disorders. In this sense, the Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment REceptors (SNARE) complex may centralize the whole brain circuitry since it is crucial to neurotransmitter release by approximating plasma and synaptic membranes (Südhof 2013). The core proteins forming neuronal SNARE complex are Synaptosomal-Associated Protein 25 (SNAP-25), Syntaxin 1A and Synaptobrevin/Vesicle Associated Membrane Protein (VAMP). They bind to each other as well as to regulatory proteins, such as Synaptotagmin 1. This regulatory protein binds to the SNARE complex when calcium inflowing occurs, changing the SNARE-binding affinity and allowing vesicles to fuse with the plasma membrane (Davletov & Südhof 1994; Tang et al. 2006).

SNAP25 gene has been widely studied regarding ADHD (Mill et al. 2002; Mill et al. 2005; Feng et al. 2005; Brookes et al. 2005; Brookes et al. 2006; Forero et al. 2009; Gizer et al. 2009; Guan et al. 2009; Zhang et al. 2011; Sarkar et al. 2012; Hawi et al. 2013; Sánchez-Mora et al. 2013; Gálvez et al. 2014; Olgiati et al. 2014; Herken et al. 2014; Gao et al. 2015). Initial evidence suggesting the involvement of *SNAP25* on the etiology of ADHD came from animal model studies, which reported that mice lacking the *SNAP25* (*Coloboma* mice) show locomotor hyperactivity, delayed achievement of behavioral milestones and abnormal catecholamine regulation (Hess et al. 1992; Hess et al. 1996; Heyser et al. 1995; Jones et al. 2001). The other genes encoding SNARE complex core components (*STX1A* and *VAMP2*) and its regulatory proteins, such as *SYT1*, have also been studied on ADHD susceptibility (Brookes et al. 2005, 2006; Guan et al. 2009; Sánchez-Mora et al. 2013; Kenar et al. 2014; Gao et al. 2015).

Since most studies on SNARE complex genes evaluated children with ADHD, we aim to analyze the effects of polymorphisms on SNARE complex genes - *STX1A* (rs2228607), *SYT1* (rs2251214 and rs1880867), *VAMP2* (indel26pb) and *SNAP25* (rs8636 and rs6108461) - in adults with ADHD. We also intend to explore the clinical heterogeneity among subjects with ADHD.

Material and Methods

Sample

The sample included 549 patients with ADHD (54.7% males; mean age 33.7 years old), diagnosed according to the DSM-IV criteria, at the Adult Division of the ADHD Outpatient Program from Hospital de Clínicas de Porto Alegre (ProDAH-A). The control sample comprised 643 subjects with negative screening for ADHD on the Adult Self- Rating Scale (ASRS) ascertained at the blood donation center from the same hospital (49.5% males; mean age 29.1 years old). All subjects included are white Brazilian adults (with 18 years of age or older) of European descent with estimated IQ higher than 70. Subjects presenting significant neurological disease that may affect cognition, head traumas, neurodegenerative disorders and history of psychosis were excluded. All participants signed informed consent form approved by the Ethics Committee of the HCPA.

The ADHD and ODD diagnosis was performed with K-SADS-E (Mercadante et al. 1995). Additionally, CD and ASPD diagnoses were assessed by Mini-International Neuropsychiatry Interview (MINI) (Sheehan et al, 1998), whereas for other psychiatric comorbidities the Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID-I) (First et al, 1998) was used. Further characterization (restricted to the ADHD sample) included the evaluation of ADHD and ODD symptoms severity by the Swanson, Nolan and Pelham Scale (SNAP-IV) (Swanson et al, 2001) and the onset of ADHD symptoms by Barkley's current and childhood symptoms scales (self-report forms) (Barkley and Murphy, 1998). All clinical interviews and diagnoses were performed by experienced psychiatrists.

Sample characteristics and frequencies of the most common comorbidities are shown in **Supplementary Table S1**.

Polymorphisms Selection and Genotyping

SNARE polymorphisms were selected based on previous evidence of association with ADHD, SNP functionality description on the literature and minor allele frequency higher than 10%. All SNPs were genotyped by Real Time PCR using Taqman allelic discrimination assays (*STX1A*-rs2228607, *SYT1*-rs2251214, *SYT1*-rs1880867, *SNAP25*-rs6108461, *SNAP25*-rs8636). Additionally, a *VAMP2* insertion/deletion polymorphism of 26pb was genotyped by PCR followed by agarose electrophoresis gel 3.5%. All tested SNPs were in the Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE). Allele and genotype frequencies are shown in **Supplementary Table S2**. Since the frequency of homozygous for the minor allele was small for several SNPs, all analysis considered a dominant model.

Statistical Analysis

Exploratory case-control analysis:

The association analyses between SNPs and ADHD susceptibility were performed by binary logistic regression in PLINK (Purcell et al. 2007). These analyses were corrected (Bonferroni) for the number of SNPs tested. Haplotypes (sliding window procedure) and 2 way interactions were also investigated.

In-depth analyses restricted to *SYT1*-rs2251214

Analyses between associated SNP (*SYT1*-rs2251214) with representative characteristics of the clinical heterogeneity of ADHD were performed with ANOVA and binary logistic regression using both PLINK and SPSS softwares. The characteristics evaluated included age of onset of ADHD, comorbidities and relevant psychosocial characteristics.

Composite variable analysis with *SYT1*-rs2251214

Considering the pattern of associations with externalizing characteristics, an additional composite variable was designed by stratifying the sample as follows: (1) controls, (2) ADHD without history of ODD, CD or ASPD, (3) ADHD with history of ODD (without CD or ASPD), (4) ADHD with history of CD (with or without ODD, but no ASPD) and (5) ADHD with ASPD. These subgroups were analyzed by chi-square followed by post-hoc comparisons (WINPEPI - Abramson 2004). A secondary case-control analysis was performed of *SYT1* excluding subjects with ASPD in order to verify if there is residual effect attributable to ADHD.

Results

Exploratory case-control analysis

We found a significant association between *SYT1*-rs2251214 and adulthood ADHD ($P=0.005$; $P_{corr} = 0.03$), where the G homozygous presented an increased risk to ADHD (**Table 1**). Haplotype analysis revealed a significant effect of the haplotype comprising *SYT1* SNPs (rs1880867 and rs2251214), however it seems to be mainly due to the rs2251214 individual effect (data available upon request). Two-way SNP-SNP interactions were evaluated but no significant effect was found. Sex and age were included as covariates in all these analyses.

*In-depth analyses restricted to *SYT1*-rs2251214*

The *SYT1*-rs2251214 SNP was also associated with age at onset of ADHD symptoms ($P = 0.028$), where the genotype associated with ADHD susceptibility (GG) predicted earlier manifestation of symptoms (Table 2). Additionally, it was associated with externalizing

behaviors, such as school problems (suspension/expulsion) ($P = 0.028$) and problems with laws and authority ($P = 0.001$). It was also associated with comorbid ASPD ($P = 0.016$) and a trend of association with SUD ($P = 0.056$). Although no association with CD ($P = 0.088$) and ODD ($P = 0.928$) diagnoses were observed, the SNP was associated with number of CD symptoms ($P = 0.014$) and with ODD severity scores ($P = 0.036$). Results according to *SYT1*-rs2251214 genotypes, along with association findings, are shown in **Tables 2 and 3**.

Composite variable with SYT1-rs2251214

The sample was categorized according to the presence of externalizing disorders as described above (i.e. controls; ADHD without ODD, CD nor ASPD; ADHD with comorbid ODD; ADHD with comorbid CD; and ADHD with comorbid ASPD). Analysis of the externalizing phenotypes subgroups revealed a significant difference concerning the *SYT1*-rs2251214 genotype frequencies ($P = 0.007$). Post-hoc analysis demonstrated that all subgroups differ from the group of ADHD with comorbid ASPD (**Table 4**). This finding elicited a secondary association analysis between ADHD patients and controls excluding subjects with comorbid ASPD. The association remained significant ($P = 0.022$) with slightly decreased odds ratios (1.421 vs. 1.327).

Discussion

We report a significant association of the *SYT1*-rs2251214 SNP with ADHD susceptibility, where G homozygous showed increased risk to ADHD. Exploring its effects on clinical heterogeneity among ADHD subjects, G homozygous presented an earlier onset of ADHD symptoms and several characteristics suggestive of a more externalizing phenotype. A composite variable further clarified the role of *SYT1*-rs2251214 on comorbid ASPD. Finally, apart from this effect, the association with ADHD remains significant when subjects with comorbid ASPD were excluded.

Although Synaptotagmin 1 plays an important role in neurotransmission, there are few genetic studies regarding its role on psychiatric disorders. In the ADHD literature, although first studies with children did not find any significant association with *SYT1* SNPs (Brookes et al.

2005, 2006) succeeding studies found several *SYT1* SNPs associated with childhood ADHD (Guan et al. 2009; Sánchez-Mora et al. 2013). In adulthood, only one study has been conducted so far and found a nominal association between *SYT1*-rs2251214 and ADHD in adults, but not in children (Sánchez-Mora et al. 2013). While in the Sánchez-Mora et al. (2013) study, G-allele confers risk to ADHD in an additive model, our findings under a dominant model are in the same direction, showing a risk effect of GG genotype.

Concerning other psychiatric disorders, a segment of chromosome 12 encompassing *SYT1* gene was implicated in Autism Spectrum Disorders in a Copy Number Variation study (Szatmari et al. 2007). Moreover, recently a rare variation in the *SYT1* gene (I368T) was associated with a neurodevelopmental disorder characterized mainly by involuntary movements, delayed motor development and severe intellectual disability; this variation seems to have a negative effect on synaptic vesicle recycling (Baker et al. 2015). Additionally, animal studies demonstrated that a rat model of depression presented increased *Syt1* mRNA levels in the hypothalamus (Ge et al. 2013).

In our study, *SYT1*-rs2251214 was also associated with age of onset of ADHD symptoms, where the G homozygous present an earlier onset. Lasky-Su et al. (2008) have already reported a nominal association of two other *SYT1* SNPs on age of ADHD onset in children. Since patients with ADHD with earlier onset have a more externalizing profile (Connor et al. 2003; Karam et al. 2009; Guimarães-da-Silva et al. 2012; Lin et al. 2015) we further explored the effect of this SNP on externalizing phenotypes among ADHD subjects. We found that G homozygous besides having increased risk and earlier onset of ADHD also present more externalizing behaviors.

The externalizing behaviors contribute to the high heterogeneity observed in ADHD and imply in negative outcomes (Loe & Feldman 2007; Karam et al. 2009), possibly with varying degrees according to the disorder (Vitola et al. 2012). The composite variable analysis reported here showed that the GG genotype frequency differ significantly in all groups when compared with the group with ADHD subjects with comorbid ASPD. There was a trend for increasing frequencies from controls < pure ADHD < ADHD with other externalizing phenotypes < ASPD. Interestingly, the association remained significant but weaker in the case-control analysis excluding subjects with comorbid ASPD. These finding suggest that *SYT1* SNPs may

be associated in varying degrees in a spectrum of externalizing behaviors. Also, together with the age of onset, these findings may be consistent with the developmental role of SNARE proteins.

The complex pattern of associations and the role of comorbidities may help to explain some of previous contradictory findings. We did not find significant association of VAMP2 indel26pb nor *STX1A*-rs2228607 on ADHD susceptibility in adults, as reported by Kenar et al. 2014 and Sánchez-Mora et al. 2013 respectively. Association with childhood ADHD and *SNAP25*-rs8636 have also been reported (Guan et al. 2009; Sarkar et al. 2012), however this finding was not replicated in other studies (Hawi et al. 2013; Sánchez-Mora et al. 2013; Gao et al. 2015) neither in our adult sample. Additionally, the association between *SNAP25*-rs6108461 and ADHD in children reported by Hawi et al. 2013 was not replicated in children (Sánchez-Mora et al. 2013) nor in our adult sample.

Regarding limitations, we highlight the lack of a sample of subjects with ASPD but without ADHD to further clarify the SNP effect on both disorders. Another issue is the lack of information on the functional role of *SYT1*-rs2251214. Despite being in an intronic region with no functionality described, it might be in linkage disequilibrium with other functional variants or have regulatory properties not described yet. Sample size certainly limited the statistical power, but the inclusion of data on consortia and meta-analyses emerges as a promising perspective for addressing this issue. Although our findings are in the same direction of Sanchez-Mora et al. (2013), their analysis was under an additive model. Testing this model, our findings remain significant, but we preferred to present only the dominant model considering the small number (n=19) of AA homozygous subjects.

In conclusion, we found a significant association of *SYT1*-rs2251214 SNP on a range of externalizing phenotypes, including ADHD itself and its age of onset, as well as other comorbid disruptive disorders. These results suggest an etiological mechanism linking different externalizing phenotypes through underlying shared genetic factors that go beyond DSM boundaries.

Acknowledgements

We would like to thank to the volunteers that made our study possible.

Financial support

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Conflict of interest

None.

References

- Abramson JH (2004) WINPEPI (PEPI-for-Windows): computer programs for epidemiologists. *Epidemiologic perspectives & innovations*, 1(1), p.6.
- Baker K, Gordon SL, Grozeva D, van Kogelenberg M, Roberts NY, Oike M, Blair E, Hurles ME, Chong WK, Baldeweg T, Kurian MA, Boyd SG, Consortium UK10K, Cousin MA, Raymond FL (2015) Identification of a human synaptotagmin-1 mutation that perturbs synaptic vesicle cycling. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(4), pp.1–9.
- Biederman, J, Monuteaux MC, Mick E, Spencer T, Willens TE, Silva, JM, Snyder LE, Faraone SV (2006) Young adult outcome of attention deficit hyperactivity disorder: a controlled 10-year follow-up study. *Psychological medicine*, 36(2), pp.167–179.
- Brikell, I, Kuja-halkola R. & Larsson H. (2015) Heritability of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder in Adults. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, pp.406–413.
- Brookes KJ, Knight J, Xu X, Asherson P (2005) DNA pooling analysis of ADHD and genes regulating vesicle release of neurotransmitters. *American Journal of Medical Genetics - Neuropsychiatric Genetics*, 139 B(1), pp.33–37.
- Brookes K, Xu X, Chen W, Zhou K, Lowe N, Aneey R, Franke B, Gill M, Ebstein R, Buitelaar J, Sham P, Campbell D, Knight J, Andreou P, Altink M, Arnold R, Boer F, Buschgens C, Butler L, Christiansen H, Feldman L, Fleishman K, Fliers E, Howe-Forbes R, Goldfarb A, Heise A, Gabriëls I, Korn-Lubetzki I, Marco R, Medad S, Minderaa R, Mulas F, Müller U, Mulligan A, Rabin K, Rommelse N, Sethna V, Sorohan J, Uebel H, Psychogiou L, Weeks A, Barret R, Crais I, Banaschewski T, Sonuga-Barke E, Eisenberg J, Kuntsi J, Manor I, McGuffin P, Miranda Am Oades RD, Plomin R, Roeyers H, Rothenberg A, Sergeant J, Steinhausen H-C, Taylor E, Thompson M, Faraone SV, Asherson P, Johansson L (2006) The analysis of 51 genes in DSM-IV combined type attention deficit hyperactivity disorder: association signals in DRD4, DAT1 and 16 other genes. *Molecular psychiatry*, 11(10), pp.934–53.
- Chang Z, Lichtenstein P, Asherson PJ, Larsson H (2013) Developmental twin study of attention problems: high heritabilities throughout development. *JAMA psychiatry*, 70(3), pp.311–8
- Connor DF, Edwards G, Fletcher KE, Baird J, Barkley RA, Steingard RJ (2003). Correlates of comorbid psychopathology in children with ADHD. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 42(2), pp.193–200.
- Davletov B & Südhof TC (1994) Ca²⁺ -dependent Conformational Change in Synaptotagmin I. *The Journal of biological chemistry*, 269(46), pp.28547–28550.
- Faraone SV & Mick E (2005) Molecular Genetics of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Biological Psychiatry* 57(11), pp.1313-23.
- Feng Y, Crosbie J, Wigg K, Pathare T, Ickowicz A, Schachar R, Tannock R, Roberts W, Malone M, Swanson J, Kennedy JL, Barr CL (2005) The SNAP25 gene as a susceptibility gene contributing to attention-deficit hyperactivity disorder. *Molecular psychiatry*, 10(11), pp.998–1005, 973.
- Forero DA, Arboleda GH, Vasquez R, Arboleda H (2009) Candidate genes involved in neural plasticity and the risk for attention-deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis of 8 common variants. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN*, 34(5), pp.361–366.

- Franke B, Faraone SV, Asherson P, Buitelaar J, Bau CH, Ramos-Quiroga JA, Mick E, Grevet EH, Johansson S, Haavik J, Lesch KP, Cormand B, Reif A; International Multicentre persistent ADHD CollaboraTion (2011) The genetics of attention deficit/hyperactivity disorder in adults, a review. *Molecular Psychiatry*, 17(10), pp.960–987.
- Gálvez JM, Forero DA, Fonseca DJ, Mateus HE, Talero-Gutierrez C, Velez-van-Meerbeke A (2014) Evidence of association between SNAP25 gene and attention deficit hyperactivity disorder in a Latin American sample. *Attention deficit and hyperactivity disorders*, 6(1), pp.19–23.
- Gao Q, Liu L, Chen Y, Li H, Yang L, Wang Y, Qian Q (2015) Synaptosome-related (SNARE) genes and their interactions contribute to the susceptibility and working memory of attention-deficit/hyperactivity disorder in males. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 57, pp.132–9.
- Ge JF, Qi CC & Zhou JN (2013) Imbalance of leptin pathway and hypothalamus synaptic plasticity markers are associated with stress-induced depression in rats. *Behavioural Brain Research*, 249, pp.38–43.
- Gillberg C, Gillberg IC, Rasmussen P, Kadesjö B, Söderström H, Råstam M, Johnson M, Rothenberger A, Niklasson L. (2004) Co-existing disorders in ADHD - Implications for diagnosis and intervention. *European Child and Adolescent Psychiatry*, 13, pp.80–92.
- Gizer IR, Ficks C & Waldman I.D (2009) Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Human Genetics*, 126(1), pp.51–90.
- Guan L, Wang B, Chen Y, Yang L, Li J, Qian Q, Wang Z, Faraone SV, Wang Y. (2009) A high-density single-nucleotide polymorphism screen of 23 candidate genes in attention deficit hyperactivity disorder: suggesting multiple susceptibility genes among Chinese Han population. *Molecular psychiatry*, 14(2009), pp.546–554.
- Guimarães-da-Silva PO, Silva KL, Grevet EH, Salgado CA, Karam RG, Victor MM, Vitola ES, Mota NR, Fischer AG, Picon FA, Bertuzzi GP, Polina ER, Rohde LA, Belmonte-de-Abreu P, Bau CH (2012) Does age of onset of impairment impact on neuropsychological and personality features of adult ADHD? *Journal of Psychiatric Research*, 46(10), pp.1307–1311.
- Hawi Z, Matthews N, Wagner J, Wallace RH, Butler TJ, Vance A, Kent L, Gill M, Bellgrove MA (2013) DNA Variation in the SNAP25 Gene Confers Risk to ADHD and Is Associated with Reduced Expression in Prefrontal Cortex. *PLoS ONE*, 8(4), pp.1–8.
- Hawi Z, Cummins TD, Tong J, Johnson B, Lau R, Samarraï W, Bellgrove MA (2015) The molecular genetic architecture of attention deficit hyperactivity disorder. *Molecular psychiatry*, 20(3), pp.289–97.
- Herken H, Erdal ME, Kenar AN, Unal GA, Cakaloz B, Ay ME, Yücel E, Edgünlü T, Sengül C (2014) Association of SNAP-25 Gene Ddel and Mnl1 Polymorphisms with Adult Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Psychiatry investigation*, 11(4), pp.476–80.
- Hess EJ, Jinnah HA, Kozak CA, Wilson MC (1992) Spontaneous locomotor hyperactivity in a mouse mutant with a deletion including the Snap gene on chromosome 2. *The Journal of Neuroscience*, 12(7), pp.2865–2874.
- Hess EJ, Collins A & Wilson C (1996) Mouse Model of Hyperkinesis Implicates SNAP-25 in Behavioral Regulation. *Journal of Neuroscience*, 16(9), pp.3104–3111.

- Heyser CJ, Wilson MC & Gold LH (199). Coloboma hyperactive mutant exhibits delayed neurobehavioral developmental milestones. *Brain research. Developmental brain research*, 89(2), pp.264–9.
- Jones MD, Williams ME & Hess EJ (2001) Abnormal presynaptic catecholamine regulation in a hyperactive SNAP-25-deficient mouse mutant. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 68(4), pp.669–76.
- Karam RG, Bau CH, Salgado CA, Kalil KL, Victor MM, Sousa NO, Vitola ES, Picon FA, Zeni GD, Rohde LA, Belmonte-de-Abreu P, Grevet EH. (2009) Late-onset ADHD in adults: Milder, but still dysfunctional. *Journal of Psychiatric Research*, 43(7), pp.697–701.
- Kenar AN, Ay Oİ, Herken H, Erdal ME (2014) Association of VAMP-2 and syntaxin 1A genes with adult attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatry Investigation*, 11(1), pp.76–83.
- Kessler RC, Adler L, Barkley R, Biederman J, Conners CK, Demler O, Faraone SV, Greenhill LL, Howes MJ, Secnik K, Spencer T, Ustun TB, Walters EE, Zaslavsky AM (2006) The prevalence and correlates of adult ADHD in the United States: results from the National Comorbidity Survey Replication. *The American journal of psychiatry*, 163(4), pp.716–23.
- Lasky-Su J, Anney RJ, Neale BM, Franke B, Zhou K, Maller JB, Vasquez AA, Chen W, Asherson P, Buitelaar J, Banaschewski T, Ebstein R, Gill M, Miranda A, Mulas F, Oades RD, Roeyers H, Rothenberger A, Sergeant J, Sonuga-Barke E, Steinhausen HC, Taylor E, Daly M, Laird N, Lange C, Faraone SV. (2008) Genome-wide association scan of the time to onset of attention deficit hyperactivity disorder. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 147(8), pp.1355–1358.
- Lin YJ, Yang LK & Gau SS (2015) Psychiatric comorbidities of adults with early- and late-onset attention-deficit/hyperactivity disorder. *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry* 7.
- Loe IM & Feldman HM (2007). Academic and educational outcomes of children with ADHD. *Journal of Pediatric Psychology*, 32(6), pp.643–654
- Mill J, Curran S, Kent L, Gould A, Hockett L, Richards S, Taylor E, Asherson P (2002) Association study of a SNAP-25 microsatellite and attention deficit hyperactivity disorder. *American journal of medical genetics*, 114(3), pp.269–271.
- Mill J, Xu X, Ronald A, Curran S, Price T, Knight J, Craig I, Sham P, Plomin R, Asherson P (2005) Quantitative trait locus analysis of candidate gene alleles associated with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in five genes:DRD4, DAT1, DRD5, SNAP-25, and 5HT1B. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 133B(1), pp.68–73.
- Nikolas M, Friderici K, Waldman I, Jernigan K, Nigg JT. (2010) Gene x environment interactions for ADHD: synergistic effect of 5HTTLPR genotype and youth appraisals of inter-parental conflict. *Behavioral and brain functions : BBF*, 6(1), p.23.
- Olgıati P, Mandelli L, Alberti S, Lia L, Serretti A, Tiwari AK, Jain U, Kennedy JL, Müller DJ (2014) Role of synaptosome-related (SNARE) genes in adults with attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatry Research*, 215(3), pp.799–800.
- Polanczyk GV, Willcutt EG, Salum GA, Kieling C, Rohde LA (2014) ADHD prevalence estimates across three decades: An updated systematic review and meta-regression analysis. *International Journal of Epidemiology*, 43(2), pp.434–442.

- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ, Sham PC (2007) PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics*, 81(3), pp.559–575.
- Sánchez-Mora C, Cormand B, Ramos-Quiroga JA, Hervás A, Bosch R, Palomar G, Nogueira M, Gómez-Barros N, Richarte V, Corrales M, Garcia-Martinez I, Corominas R, Guijarro S, Bigorra A, Bayés M, Casas M, Ribasés M (2013) Evaluation of common variants in 16 genes involved in the regulation of neurotransmitter release in ADHD. *European Neuropsychopharmacology*, 23(6), pp.426–435.
- Sarkar K, Bhaduri N, Ghosh P, Sinha S, Ray A, Chatterjee A, Mukhopadhyay K (2012) Role of SNAP25 explored in eastern Indian attention deficit hyperactivity disorder probands. *Neurochemical research*, 37(2), pp.349–57
- Simon V, Czobor P, Bálint S, Mészáros A, Bitter I (2009) Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis. *The British journal of psychiatry: the journal of mental science*, 194(3), pp.204–211.
- Sobanski E (2006) Psychiatric comorbidity in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 256, pp.26–31.
- Südhof, TC (2013) Neurotransmitter release: The last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*, 80(2009), pp.675–690.
- Szatmari P, Autism Genome Project Consortium, Paterson AD, Zwaigenbaum L, Roberts W, Brian J, Liu XQ, Vincent JB, Skaug JL, Thompson AP, Senman L, Feuk L, Qian C, Bryson SE, Jones MB, Marshall CR, Scherer SW, Veland VJ, Bartlett C, Mangin LV, Goedken R, Segre A, Pericak-Vance MA, Cuccaro ML, Gilbert JR, Wright HH, Abramson RK, Betancur C, Bourgeron T, Gillberg C, Leboyer M, Buxbaum JD, Davis KL, Hollander E, Silverman JM, Hallmayer J, Lotspeich L, Sutcliffe JS, Haines JL, Folstein SE, Piven J, Wassink TH, Sheffield V, Geschwind DH, Bucan M, Brown WT, Cantor RM, Constantino JN, Gilliam TC, Herbert M, Lajonchere C, Ledbetter DH, Lese-Martin C, Miller J, Nelson S, Samango-Sprouse CA, Spence S, State M, Tanzi RE, Coon H, Dawson G, Devlin B, Estes A, Flodman P, Klei L, McMahon WM, Minshew N, Munson J, Korvatska E, Rodier PM, Schellenberg GD, Smith M, Spence MA, Stodgell C, Tepper PG, Wijsman EM, Yu CE, Rogé B, Mantoulan C, Wittemeyer K, Poustka A, Felder B, Klauck SM, Schuster C, Poustka F, Bölte S, Feineis-Matthews S, Herbrecht E, Schmötzer G, Tsiantis J, Papanikolaou K, Maestrini E, Bacchelli E, Blasi F, Carone S, Toma C, Van Engeland H, de Jonge M, Kemner C, Koop F, Langemeijer M, Hijmans C, Staal WG, Baird G, Bolton PF, Rutter ML, Weisblatt E, Green J, Aldred C, Wilkinson JA, Pickles A, Le Couteur A, Berney T, McConachie H, Bailey AJ, Francis K, Honeyman G, Hutchinson A, Parr JR, Wallace S, Monaco AP, Barnby G, Kobayashi K, Lamb JA, Sousa I, Sykes N, Cook EH, Guter SJ, Leventhal BL, Salt J, Lord C, Corsello C, Hus V, Weeks DE, Volkmar F, Tauber M, Fombonne E, Shih A, Meyer KJ (2007) Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nature genetics*, 39(3), pp.319–28.
- Tang J, Maximov A, Shin OH, Dai H, Rizo J, Südhof TC (2006) A Complexin/Synaptotagmin 1 Switch Controls Fast Synaptic Vesicle Exocytosis. *Cell*, 126, pp.1175–1187.
- Vitola ES, Salgado CA, Silva KL, Karam RG, Victor MM, Mota NR, Contini V, Picon FA, Guimarães-da-Silva PO, Giordani RS, Rohde LA, Belmonte-de-Abreu P, Bau CH, Grevet EH (2012) The role of a lifetime history of oppositional defiant and conduct disorders in adults with ADHD: implications for clinical practice. *CNS Spectrums*, 17(02), pp.94–99.

Zhang H, Zhu S, Zhu Y, Chen J, Zhang G, Chang H (2011) An association study between SNAP-25 gene and attention-deficit hyperactivity disorder. *European journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society*, 15(1), pp.48–52.

Table 1 Analysis of the influence of SNARE complex gene variants on ADHD susceptibility

Genotype	Reference Genotype	df	OR (CI 95%)	P-Value
<i>STX1A</i> - rs2228607	AA	1	0.9619 (0.7171-1.29)	0.795
<i>SYT1</i> - rs1880867	TT	1	1.055 (0.8328-1.336)	0.658
<i>SYT1</i> - rs2251214	GG	1	1.421 (1.112-1.817)	0.005 / 0.03*
<i>VAMP2</i> - indel26bp	Ins/ins	1	0.9435 (0.7228-1.232)	0.669
<i>SNAP25</i> - rs6108461	GG	1	1.028 (0.7921-1.333)	0.838
<i>SNAP25</i> - rs8636	CC	1	1.044 (0.8194-1.331)	0.726

ADHD: Attention Deficit/Hyperactivity Disorder; OR: Odds Ratio; CI: Confidence Interval; *STX1A*, *SYT1*, *VAMP2* and *SNAP25*: gene coding Syntaxin 1A, Synaptotagmin 1 VAMP-2 and SNAP-25, respectively. Age and sex was used as covariates.

*Pcorr; corrected for multiple comparisons

Table 2 Quantitative variables of SYT1-rs2251214 on age of symptoms onset and externalizing behavior among adults with ADHD.

Variable	Total	rs2251214-GG	rs2251214-A+	P-value
	<i>Mean (SD)</i>	<i>Mean (SD)</i>	<i>Mean (SD)</i>	
Age of ADHD symptoms onset	7.97 (4.37)	7.67 (3.51)	8.56 (5.65)	0.028
ADHD severity scores	30.30 (9.51)	30.56 (9.68)	29.83 (9.18)	0.395
ODD severity scores	7.51 (4.73)	7.83 (4.91)	6.92 (4.35)	0.036
CD symptoms (≤ 15 years old)	0.80 (1.12)	0.88 (1.20)	0.63 (0.95)	0.014

A+: A carriers (AA + AG). SD: Standard Deviation; ODD: Opposite Defiant Disorder and CD: Conduct Disorders.

Table 3 Categorical variables of *SYTI*-rs2251214 in externalizing behavior among adults with ADHD.

Variable	Total	rs2251214 – GG	rs2251214 – A+	OR (CI 95%)	P-value
	<i>n (%)</i>	<i>n (%)</i>	<i>n (%)</i>		
School expulsion/suspension					
Yes	170 (31.5)	122 (71.8)	48 (28.2)	1.554 (1.047-2.306)	0.028
No	369 (68.5)	229 (62.0)	140 (38.0)		
Law and authority problems					
Yes	232 (43.0)	169 (72.8)	63 (27.2)	1.842 (1.275-2.662)	0.001
No	307 (57.0)	182 (59.3)	125 (40.7)		
SUD					
Yes	101 (18.8)	74 (73.3)	27 (26.7)	1.599 (0.9877-2.588)	0.056
No	437 (81.2)	276 (63.2)	161 (36.8)		
Tobacco smoking					
Yes	234 (43.4)	155 (66.2)	79 (33.8)	1.091 (0.7627-1.561)	0.633
No	305 (56.6)	196 (64.3)	109 (35.7)		
ODD					
Yes	268 (53.6)	172 (64.2)	96 (35.8)	1.017 (0.7051-1.466)	0.928
No	232 (46.4)	148 (63.8)	84 (36.2)		
CD (≤15 years old) *					
Yes	108 (20.2)	78 (72.2)	30 (27.8)	1.497 (0.9402-2.382)	0.089
No	427 (79.8)	271 (63.5)	156 (36.5)		
ASPD					
Yes	34 (6.4)	29 (85.3)	5 (14.7)	3.281 (1.248-8.623)	0.016
No	501 (93.6)	320 (63.9)	181 (36.1)		

A+: A carriers (AA + AG). SD: Standard Deviation; OR: Odds Ratio; CI: Confidence Interval; ASPD: Antisocial Personality Disorder; SUD: Substance Use Disorder; ODD: Opposite Defiant Disorder and CD: Conduct Disorders. *retrospective data

Table 4 Genotype frequencies of *SYT1*-rs2251214 in externalizing comorbidities according to composite variable.

	¹ Controls	² ADHD*	³ ADHD + ODD	⁴ ADHD + CD	^{1,2,3,4} ADHD + ASPD
<i>SYT1</i> -rs2251214	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)
GG	352 (57.4)	125 (63.1)	144 (63.7)	50 (67.6)	29 (85.3)
A+	261 (42.6)	73 (36.9)	82 (36.3)	24 (32.4)	5 (14.7)

*without ODD, CD and ASPD comorbidities. A+: A carriers (AA + AG); ADHD: Attention Deficit Hyperactivity Disorder; ODD: Opposite Defiant Disorder; CD: Conduct Disorder. Multiple comparisons P-Value: ¹ P < 0.001, ² P = 0.003, ³ P = 0.006, ⁴ P = 0.042.

Supplementary Table S1 Characteristic of participants

	ADHD n = 549	Controls n = 643
Gender (male)	301 (54.5)	318 (49.4)
Age (years)	33.7 (10.8)	29.1 (8.7)
<i>Comorbidities – lifetime</i>		
Opposite Defiant Disorder	271 (49.4)	24 (3.7)
Major Depressive Disorder	210 (38.2)	179 (27.8)
Conduct Disorder	111 (20.2)	1 (0)
Generalized Anxiety Disorder	110 (20.0)	66 (10.3)
Substance Use Disorder	102 (18.6)	22 (3.4)
Bipolar Disorder	92 (16.7)	19 (2.9)
Antisocial Personality Disorder	34 (6.2)	0 (0)

Data are represented as n (%) or mean (standard deviation).

Supplementary Table S2 Allele and genotype frequencies.

	ADHD (n = 549)	Control (n= 643)
<i>STX1A</i> – rs2228607		
A	242 (44.1)	301 (46.8)
G	296 (53.9)	339 (52.7)
AA	108 (19.7)	129 (20.0)
AG	267 (48.6)	343 (53.2)
GG	163 (29.7)	168 (26.0)
<i>SYT1</i> – rs1880867		
G	169 (30.8)	204 (31.7)
T	368 (67.0)	438 (68.2)
GG	59 (10.7)	64 (9.9)
GT	219 (39.9)	280 (43.4)
TT	259 (47.2)	298 (46.2)
<i>SYT1</i> – rs2251214		
A	102 (18.6)	151 (23.5)
G	431 (78.5)	531 (82.6)
AA	19 (3.5)	35 (5.4)
AG	165 (30.1)	232 (36.0)
GG	348 (63.4)	370 (57.4)
<i>VAMP2</i> – indel26bp		
Ins	469 (85.4)	556 (86.5)
Del	80 (14.6)	85 (13.2)
Ins/Ins	399 (72.7)	477 (74.0)
Del/Ins	140 (25.5)	159 (24.7)
Del/Del	10 (1.8)	5 (0.8)
<i>SNAP25</i> – rs6108461		
A	243 (44.3)	296 (46.0)
G	295 (53.7)	347 (54.0)
AA	106 (19.1)	130 (20.2)
AG	274 (49.9)	332 (51.5)
GG	158 (28.8)	181 (28.1)
<i>SNAP25</i> – rs8636		
C	337 (61.4)	406 (63.1)
T	182 (33.2)	233 (36.2)
CC	217 (39.5)	254 (39.4)
CT	240 (43.7)	304 (47.1)
TT	62 (11.3)	81 (12.6)

ADHD: Attention Deficit/Hyperactivity Disorder; *STX1A*, *SYT1*, *VAMP2* and *SNAP25*: genes coding Syntaxin 1A, Synaptotagmin 1 VAMP-2 and SNAP-25, respectively

Capítulo IV

4. Discussão Geral

Os estudos genéticos em fenótipos multifatoriais têm evoluído do ponto de vista de possibilidades, tanto em técnicas laboratoriais, com as plataformas de microarranjos genômicos, quanto em termos analíticos, contando com programas de computador capazes de processar o enorme volume de dados novos. No entanto, apesar disso, a identificação de mecanismos específicos continua a desafiar os pesquisadores em todo o mundo. A perspectiva de estudo que ainda predomina na maioria dos centros de pesquisa é, então, a delimitação de focos de análise utilizando-se de hipóteses prévias baseadas no conhecimento existente a partir da fisiopatologia dos transtornos. Essas hipóteses geralmente provêm de modelos animais disponíveis ou estudos bioquímicos. Com base nisso, a presente dissertação teve por tema a genética do complexo SNARE, sistema com um papel central na liberação de neurotransmissores na fenda sináptica.

Os nossos resultados contribuem com o conhecimento existente sobre o papel dos genes do complexo SNARE sobre a patofisiologia do TDAH e de outros fenótipos externalizantes de duas maneiras principais. Em primeiro lugar, por replicar a associação do *SYTI*-rs2251214 com a susceptibilidade ao TDAH em adultos (Sanchez-Mora et al. 2014). As replicações são um elemento crucial para dar consistência e validar os achados em fenótipos multifatoriais. Assim, na genética psiquiátrica, muitas vezes as replicações são mais valorizadas do que achados originais, uma vez que aumentam a confiabilidade do resultado, diminuindo a chance de falsos-positivos.

Em segundo lugar, também apresentamos dados originais (admitindo a necessidade de futuras replicações – ver perspectivas abaixo) ao expandir o efeito desse SNP para a idade de início dos sintomas do TDAH e uma série de fenótipos externalizantes. O genótipo GG, além de conferir maior susceptibilidade ao transtorno em si, também leva a uma manifestação mais precoce dos sintomas. Tendo em vista que tal início mais precoce está associado a um perfil mais externalizante, nós decidimos explorar o efeito desse SNP também sobre outros fenótipos externalizantes. Nossos resultados apontam a associação do *SYTI*-rs2251214 com importantes desfechos negativos relacionados a comportamentos externalizantes, como expulsões, suspensões, problemas com autoridade/disciplina e problemas com lei/polícia. Além disso, nosso estudo revelou um importante papel da *SYTI* sobre o TPAS comórbido e sobre sintomas de TOD e TC. Esse efeito da *SYTI* sobre o espectro externalizante pode estar refletindo o

importante papel desempenhado pelo Complexo SNARE no neurodesenvolvimento, visto que alguns desses transtornos, como TOD e TC, geralmente iniciam na infância.

No entanto não encontramos associação com *VAMP2*-indel26pb nem com a *STX1A*-rs2228607, como encontrado por Kenar et al. 2014 e Sánchez-Mora et al. 2013, respectivamente. Existem evidências de associação do *SNAP25*-rs8636 e do *SNAP25*-rs6108461 com TDAH em crianças (Guan et al. 2009; Sarkar et al. 2012; Hawi et al. 2013), no entanto, os resultados são contraditórios (Hawi et al. 2013; Sánchez-Mora et al. 2013; Gao et al. 2015).

Existem evidências de que os transtornos externalizantes possam ser vistos como um só construto, compartilhando mecanismos fisiopatológicos e psicopatológicos, e parecem também apresentar fatores genéticos e ambientais em comum (Young et al. 2000; Krueger et al. 2002; Acosta et al. 2004; Arcos-Burgos et al. 2004; Elia et al. 2009; Arcos-Burgos & Muenke 2010; Martinez et al. 2011; Arcos-Burgos et al. 2012). Essa visão vai de acordo com nossos resultados, onde o *SYT1* parece afetar diversos fenótipos de um espectro externalizante, não respeitando limites de diagnóstico.

O estudo também pode constituir-se em um exemplo da pleiotropia em estudos genéticos. Outro estudo do nosso grupo (Mota et al. 2015) foi recentemente destacado por representar uma abordagem especial nos estudos de gene candidato por incluir a perspectiva da pleiotropia (Franke 2015). Tal abordagem enfatiza a importância de uma amostra bem caracterizada, levando em conta a heterogeneidade clínica dos transtornos. Esta é a perspectiva mais moderna dentro da psiquiatria, sendo de extrema relevância por subsidiar o desenvolvimento de novos estudos já voltados para fenótipos mais próximos da base biológica dos transtornos, tal como preconizado pelo National Institute of Mental Health (NIMH) no quadro de investigação RDoC (Reserach Domain Criteria Initiative).

A presente dissertação responde a algumas perguntas, mas, principalmente, gera hipóteses e perspectivas de pesquisa. Uma delas, a mais imediata, é a replicação dos achados relacionados com a associação entre *SYT1* e fenótipos externalizantes. Para tanto, nossa perspectiva em relação a esse estudo é colaborar com o grupo da Espanha (o qual reportou primeiramente a associação do *SYT1*-rs2251214 com TDAH em adultos), a fim de explorar o efeito da *SYT1* sobre fenótipos externalizantes também na amostra deles. Esse grupo, assim como o nosso, é membro do IMPACT (*International Multi-centre persistent ADHD*

Collaboration). Acreditamos que atualmente grandes colaborações sejam essenciais na melhor compreensão de fatores genéticos envolvidos na etiologia dos transtornos psiquiátricos. Já que estas possibilitam replicações e viabilizam estudos com amostras maiores, o que tem se mostrado necessário devido ao pequeno tamanho de efeito esperado dos fatores genéticos sobre transtornos psiquiátricos. Outra perspectiva é relacionar tais achados com dados de neuroimagem estrutural e funcional, a ser desenvolvida em meu projeto de doutorado.

5. Referências Bibliográficas

- Abou Jamra R, Gobina CM, Becker T, Georgi A, Schulze TG, Schmael C, Cichon S, Propping P, Rietschel M, Nöthen MM et al (2008) Association study between genetic variants at the VAMP2 and VAMP3 loci and bipolar affective disorder. *Psychiatr Genet*, 18(4):199–203.
- Achenbach TM (1966) The classification of children's psychiatric symptoms: a factor-analytic study. *Psychol Monogr*, 80(7):1–37.
- Acosta MT, Arcos-Burgos M. & Muenke M (2004) Attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD): Complex phenotype, simple genotype? *Genet Med*, 6(1):1–15.
- APA - American Psychiatric Association (1994) Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM). 4th edition. Washington, DC.
- APA - American Psychiatric Association (2013) Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM). 5th edition. Washington, DC.
- Araque A, Li N, Doyle RT, Haydon PG (2000) SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci*, 20(2):666–673.
- Arcos-Burgos M. & Muenke M (2010) Toward a better understanding of ADHD: LPHN3 gene variants and the susceptibility to develop ADHD. *Atten Defic Hyperact Disord*, 2(3):139–47.
- Arcos-Burgos M, Castellanos FX, Konecki D, Lopera F, Pineda D, Palacio JD, Rapoport JL, Berg K, Bailey-Wilson J, Muenke M (2004) Pedigree disequilibrium test (PDT) replicates association and linkage between DRD4 and ADHD in multigenerational and extended pedigrees from a genetic isolate. *Mol Psychiatry*, 9(3):252–9.
- Arcos-Burgos M, Vélez JI, Solomon BD, Muenke M (2012) A common genetic network underlies substance use disorders and disruptive or externalizing disorders. *Hum Genet*, 131(6):917–929
- Arien H, Wiser O, Arkin IT, Leonov H, Atlas D (2003) Syntaxin 1A modulates the voltage-gated L-type calcium channel (Cav1.2) in a cooperative manner. *J Biol Chem*, 278(31):29231–29239.
- Bark IC, Hahn KM, Ryabinin AE, Wilson MC (1995) Differential expression of SNAP-25 protein isoforms during divergent vesicle fusion events of neural development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(5):1510–4.
- Bark C, Bellinger FP, Kaushal A, Mathews JR, Partridge LD, Wilson MC (2004) Developmentally Regulated Switch in Alternatively Spliced SNAP-25 Isoforms Alters Facilitation of Synaptic Transmission. *J Neurosci*, 24(40):8796–8805.

- Barkley R & Brown TE (2008) Unrecognized attention-deficit/hyperactivity disorder in adults presenting with other psychiatric disorders. *CNS spectrums*, 13(11):977–84.
- Barr CL, Feng Y, Wigg K, Bloom S, Roberts W, Malone M, Schachar R, Tannock R, Kennedy JL (2000) Identification of DNA variants in the SNAP-25 gene and linkage study of these polymorphisms and attention-deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*, 5(4):405–9.
- Bear M, Connors B & Paradiso M (2007) *Neuroscience*. 3rd edition, Lippincott Williams & Wilkins.
- Beesdo-Baum K, Höfler M, Gloster AT, Klotsche J, Lieb R, Beauducel A, Bühner M, Kessler RC, Wittchen HU (2009) The structure of common mental disorders: a replication study in a community sample of adolescents and young adults. *Int J Methods Psychiatric Res*, 18(4):204–20.
- Bharat TA, Malsam J, Hagen WJ, Scheutzow A, Söllner TH, Briggs JA (2014) SNARE and regulatory proteins induce local membrane protrusions to prime docked vesicles for fast calcium-triggered fusion. *EMBO Rep*, 15(3):308–14.
- Biederman J (2005) Attention-deficit/hyperactivity disorder: A selective overview. *Biol Psychiatry*, 57(11):1215–20.
- Biederman, J, Petty CR, Monuteaux MC, Mick E, Parcell T, Westerberg D, Faraone SV (2008) The Longitudinal Course of Comorbid Oppositional Defiant Disorder in Girls With Attention-deficit/hyperactivity disorder: Findings From a Controlled 5-Year Prospective Longitudinal Follow-Up Study. *J Dev Behav Pediatr*, 29(6):501-7.
- Biederman J, Fried R, Hammerness P, Surman C, Mehler B, Petty CR, Faraone SV, Miller C, Bourgeois M, Meller B, Godfrey KM, Baer L, Reimer B (2012) The effects of lisdexamfetamine dimesylate on driving behaviors in young adults with ADHD assessed with the Manchester driving behavior questionnaire. *J Adolesc Health*, 51(6):601–7.
- Binda F, Dipace C, Bowton E, Robertson SD, Lute BJ, Fog JU, Zhang M, Sen N, Colbran RJ, Gnegy ME et al (2009) Syntaxin 1A interaction with the dopamine transporter promotes amphetamine-induced dopamine efflux. *Mol Pharmacol*, 74(4):1101–8.
- Boschert U, O'Shaughnessy C, Dickinson R, Tessari M, Bendotti C, Catsicas S, Pich EM (1996) Developmental and plasticity-related differential expression of two SNAP-25 isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol*, 367(2):177–93.
- Breda V, Rovaris DL, Vitola ES, Mota NR, Blaya-Rocha P, Salgado CA, Victor MM, Picon FA, Karam RG, Silva KL et al (2015) Does collateral retrospective information about childhood attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms assist in the diagnosis of attention-deficit/hyperactivity disorder in adults? Findings from a large clinical sample. *Aust N Z J Psychiatry*. pii: 0004867415609421. [Epub ahead of print]

- 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 B Neuropsychiatric Genet*, 139B(1), pp.33–37.
- Brookes K, Xu X, Chen W, Zhou K, Neale B, Lowe N, Anney R, Franke B, Gill M, Ebstein R et al (2006) The analysis of 51 genes in DSM-IV combined type attention deficit hyperactivity disorder: association signals in DRD4, DAT1 and 16 other genes. *Mol Psychiatry*, 11(10):934–53.
- Brophy K, Hawi Z, Kirley A, Fitzgerald M, Gill M (2002) Synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25) and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): evidence of linkage and association in the Irish population. *Mol Psychiatry*, 7(8):913–7.
- Cantwell DP (1972) Psychiatric Illness in the Families of Hyperactive Children. *Arch Gen Psychiatry*, 27(3):414-7.
- Carroll LS, Kendall K, O'Donovan MC, Owen MJ, Williams NM (2009) Evidence that putative ADHD low risk alleles at SNAP25 may increase the risk of schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 150B(7):893–9.
- de Carvalho HW1, Andreoli SB, Vaidyanathan U, Patrick CJ, Quintana MI, Jorge MR (2013) The structure of common mental disorders in incarcerated offenders. *Compr Psychiatry*, 54(2):111–6.
- Caspi A, Moffitt TE, Newman DL, Silva PA (1996) Behavioral observations at age 3 years predict adult psychiatric disorders: Longitudinal evidence from a birth cohort. *Arch Gen Psychiatry*, 53(11):1033–9.
- Castells X, Ramos-Quiroga JA, Rigau D, Bosch R, Nogueira M, Vidal X, Casas M (2011) Efficacy of methylphenidate for adults with attention-deficit hyperactivity disorder: a meta-regression analysis. *CNS drugs*, 25(2):157–69.
- Chang S, Zhang W, Gao L, Wang J (2012) Prioritization of candidate genes for attention deficit hyperactivity disorder by computational analysis of multiple data sources. *Protein Cell*, 3(7):526–534.
- Chang Z, Lichtenstein P, Asherson PJ, Larsson H (2013) Developmental twin study of attention problems: high heritabilities throughout development. *JAMA Psychiatry*, 70(3):311–8.
- Connor DF, Edwards G, Fletcher KE, Baird J, Barkley RA, Steingard RJ (2003) Correlates of comorbid psychopathology in children with ADHD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 42(2):193–200.
- Copeland WE, Shanahan L, Costello J, Angold A (2009) Childhood and Adolescent Psychiatric Disorders predict which Young Adult Disorders Arch Gen Psychiatry,

66(7):764–72.

- Corradini I, Verderio, C, Sala M, Wilson MC, Matteoli M (2009) SNAP-25 in neuropsychiatric disorders. *Ann N Y Acad Sci*, 1152:93–9.
- Cosgrove VE, Rhee SH, Gelhorn HL, Boeldt D, Corley RC, Ehringer MA, Young SE, Hewitt JK (2011) Structure and Etiology of Co-occurring Internalizing and Externalizing Disorders in Adolescents, *J Abnorm Child Psychol* 39(1), 109–23.
- Diaz A, Eisenberg N, Valiente C, VanSchyndel, Spinrad TL, Berger R, Hernandez MM, Silva KM, Southworth J (2015) Relations of positive and negative expressivity and effortful control to kindergarteners' student–teacher relationship, academic engagement, and externalizing problems at school. *J Res Pers*.
- Dipace C, Sung U, Binda F, Blakely RD, Galli A (2007) Amphetamine induces a calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent reduction in norepinephrine transporter surface expression linked to changes in syntaxin 1A/transporter complexes. *Mol Pharmacology*, 71(1), pp.230–9.
- Durdiaková J, Warrier V, Banerjee-Basu S, Baron-Cohen S1, Chakrabarti B (2014) STX1A and Asperger syndrome: a replication study. *Mol Autism*, 18;5(1):14.
- Ebejer JL, Medland SE, van der Werf J, Gondro C, Henders AK, Lynskey M, Martin NG, Duffy DL (2012) Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Australian Adults: Prevalence, Persistence, Conduct Problems and Disadvantage. *PLoS ONE*, 7(10): e47404.
- Edgünlü, TG, Özge A, Yalin OO, Kul S, Erdal ME (2012) Genetic Variants of Synaptic Vesicle and Presynaptic Plasma Membrane Proteins In Alzheimer's Disease. *Archives of Neuropsychiatry*, 49(4): 294–9.
- Eisenberg N, Cumberland A, Spinrad TL, Fabes RA, Shepard SA, Reiser M, Murphy BC, Losoya SH, Guthrie IK (2001) The relations of regulation and emotionality to children's externalizing and internalizing problem behavior. *Child Dev*, 72(4):1112–34.
- Elia J, Arcos-Burgos M, Bolton KL, Ambrosini PJ, Berrettini W, Muenke M (2009) ADHD latent class clusters: DSM-IV subtypes and comorbidity. *Psychiatry Res*, 170(2-3):192–8.
- Falbo V, Floridia G, Gaudi S, Zoraqi G, Taruscio D. (2002) A new polymorphism in the flanking region of human VAMP2 and hPer1 genes. *Mol Cell Probes*, 16(5):391–2.
- Fanouso AH, Zhao Z, van den Oord EJ, Maher BS, Thiselton DL, Bergen SE, Wormley B, Bigdeli T, Amdur RL, O'Neill FA et al (2010) Association study of SNAP25 and schizophrenia in Irish family and case-control samples. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 153B(2):663–74.

- Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE, Smoller JW, Goralnick JJ, Holmgren MA, Sklar P (2005) Molecular Genetics of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Biol Psychiatry*, 57(11):1313–23.
- Faraone SV, Biederman J & Mick E (2006) The age-dependent decline of Attention Deficit Hyperactivity Disorder: a meta-analysis of follow-up studies. *Psychol Med*, 36(2): 159-65.
- Fatseas M, Debrabant R. & Auriacombe M (2012) The diagnostic accuracy of attention-deficit/hyperactivity disorder in adults with substance use disorders. *Curr Opin Psychiatry*, 25(3):219–25.
- Feng Y, Crosbie J, Wigg K, Pathare T, Ickowicz A, Schachar R, Tannock R, Roberts W, Malone M, Swanson J, Kennedy JL, Barr CL (2005) The SNAP25 gene as a susceptibility gene contributing to attention-deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*, 10(11):998–1005, 973.
- Finn PR, Mazas CA, Justus AN, Steinmetz J, 2002. Early-onset alcoholism with conduct disorder: go/no go learning deficits, working memory capacity, and personality. *Alcohol Clin Exp Res*, 26(2):186–206.
- Flory K, Molina BS, Pelham WE Jr, Gnagy E, Smith B (2006) Childhood ADHD predicts risky sexual behavior in young adulthood. *J Clin Child Adolesc Psychol* 35(4):571–7.
- Forero DA, Arboleda GH, Vasquez R, 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 Neuroscience* 34(5):361–6.
- Franke, Barbara (2015) ADHD across the lifespan—IMpACT on genetics of adult ADHD. *Am J Med Genet B: Neuropsychiatr Genet* 168.6: 403-5.
- Franke B, Neale BM & Faraone SV, (2009) Genome-wide association studies in ADHD. *Hum Genet*, 126(1):13–50.
- Franke B, Faraone SV, Asherson P, Buitelaar J, Bau CH, Ramos-Quiroga JA, Mick E, Grevet EH, Johansson S; International Multicentre persistent ADHD CollaboraTion (2011). The genetics of attention deficit/hyperactivity disorder in adults, a review. *Mol Psychiatry*, 17(10):960–87.
- Frick PJ (2009) Extending the construct of psychopathy to youth: Implications for understanding, diagnosing, and treating antisocial children and adolescents. *Can J Psychiatry*, 54(12):803–12.
- Friedman NP, Miyake A, Young SE, Defries JC, Corley RP, Hewitt JK (2008) Individual

- differences in executive functions are almost entirely genetic in origin. *J Exp Psychol Gen*, 137(2): 201–25.
- Fukuda M, Ogata Y, Saegusa C, Kanno E, Mikoshiba K (2002) Alternative splicing isoforms of synaptotagmin VII in the mouse, rat and human. *Biochem J*, 365(Pt 1):173–80.
- Gálvez JM, Forero DA, Fonseca DJ, Mateus HE, Talero-Gutierrez C, Velez-van-Meerbeke . (2014) Evidence of association between SNAP25 gene and attention deficit hyperactivity disorder in a Latin American sample. *Atten Deficit Hyperactivity Disorders*, 6(1), pp.19–23.
- Gao Q, Liu L, Chen Y, Li H, Yang L, Wang Y, Qian Q (2015) Synaptosome-related (SNARE) genes and their interactions contribute to the susceptibility and working memory of attention-deficit/hyperactivity disorder in males. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 57:132–9.
- Geppert M, Goda Y, Hammer RE, Li C, Rosahl TW, Stevens CF, Südhof TC (1994) Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell*, 79(4):717–27.
- Gillberg C, Gillberg IC, Rasmussen P, Kadesjö B, Söderström H, Råstam M, Johnson M, Rothenberger A, Niklasson L (2004) Co-existing disorders in ADHD - Implications for diagnosis and intervention. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 13:80–92.
- Gizer IR, Ficks C & Waldman ID (2009) Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet*, 126(1):51–90.
- Griffith J, Zinbarg RE, Craske MG, Mineka S, Rose RD, Waters AM, Sutton JM (2010) Neuroticism as a common dimension in the internalizing disorders. *Psychol Med*, 40(07):1125–36.
- Guan L, Wang B, Chen Y, Yang L, Li J, Qian Q, Wang Z, Faraone SV, Wang Y (2009) A high-density single-nucleotide polymorphism screen of 23 candidate genes in attention deficit hyperactivity disorder: suggesting multiple susceptibility genes among Chinese Han population. *Mol Psychiatry*, 14(2009):546–54.
- Guimarães-da-Silva PO, Silva KL, Grevet EH, Salgado CA, Karam RG, Victor MM, Vitola ES, Mota NR, Fischer AG, Picon FA et al (2012) Does age of onset of impairment impact on neuropsychological and personality features of adult ADHD? *J Psychiatr Res*, 46(10):1307–11.
- Haase J, Killian AM, Magnani F, Williams C (2001) Regulation of the serotonin transporter by interacting proteins. *Biochem Soc Trans*, 29(6):722–8.
- Hamilton SS & Armando J (2008) Oppositional defiant disorder. *Am Fam Physician*, 78(7):861–6.

- Hamshere ML, Langley K, Martin J, Agha SS, Stergiakouli E, Anney RJ, Buitelaar J, Faraone SV, Lesch KP, Neale BM, et al (2013) High loading of polygenic risk for ADHD in children with comorbid aggression. *Am J Psychiatry*, 170(8):909–16.
- Harpold T, Biederman J, Gignac M, Hammerness P, Surman C, Potter A, Mick E (2007) Is oppositional defiant disorder a meaningful diagnosis in adults? Results from a large sample of adults with ADHD. *J Nerv Ment Dis*, 195(7):601–5.
- Hawi Z, Matthews N, Wagner J, Wallace RH, Butler TJ, Vance A, Kent L, Gill M, Bellgrove MA (2013) DNA Variation in the SNAP25 Gene Confers Risk to ADHD and Is Associated with Reduced Expression in Prefrontal Cortex. *PLoS ONE*, 8(4):e60274.
- Hawi Z, Cummins TD, Tong J, Johnson B, Lau R, Samarraï W, Bellgrove MA (2015) The molecular genetic architecture of attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*, 20(3):289–97.
- Hepp R. & Langley K (2001) SNAREs during development. *Cell Tissue Res*, 305(2):247–253.
- Hepp R, Dupont JL, Aunis D, Langley K, Grant NJ (2001) NGF enhances depolarization effects on SNAP-25 expression: induction of SNAP-25b isoform. *Neuroreport*, 12(4):673–7.
- Hess EJ, Collins A & Wilson C (1996) Mouse Model of Hyperkinesis Implicates SNAP-25 in Behavioral Regulation. *J Neurosci*, 16(9):3104–11.
- Hess EJ, Jinnah HA, Kozak CA, Wilson MC (1992) Spontaneous locomotor hyperactivity in a mouse mutant with a deletion including the Snap gene on chromosome 2. *J Neuroscience*, 12(7):2865–74.
- Heyser CJ, Wilson MC & Gold LH (1995) Coloboma hyperactive mutant exhibits delayed neurobehavioral developmental milestones. *Brain Res Dev Brain Res*, 89(2):264–9.
- Hinney A, Hinney A, Scherag A, Jarick I, Albayrak Ö, Pütter C, Pechlivanis S, Dauvermann MR, Beck 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):888–97.
- Hodel A (1998) SNAP-25. *Int J Biochem Cell Biol*, 30:1069–73.
- Howard MO, Kivlahan D & Walker RD (1997) Cloninger's tridimensional theory of personality and psychopathology: applications to substance use disorders. *J Stud Alcohol*, 58(1):48–66.
- Iacono WG, Malone SM & McGue M (2008) Behavioral disinhibition and the development of early-onset addiction: common and specific influences. *Annual Rev Clin Psychol*, 4:325–48.

- Jacob C, Gross-Lesch S, Jans T, Geissler J, Reif A, Dempfle A, Lesch KP (2014) Internalizing and externalizing behavior in adult ADHD. *Atten Defic Hyperact Disord*, 6(2):101–10.
- Jensen PS, Martin D & Cantwell DP (1997) Comorbidity in ADHD: implications for research, practice, and DSM-V. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 36(8):1065–79.
- Johansson, JU, Ericsson J, Janson J, Beraki S, Stanić D, Mandić SA, Wikström MA, Hökfelt T, Ogren SO, Rozell B et al (2008) An ancient duplication of exon 5 in the Snap25 gene is required for complex neuronal development/function. *PLoS Genet*, 4(11):e1000278.
- Jones MD, Williams ME & Hess EJ (2001) Abnormal presynaptic catecholamine regulation in a hyperactive SNAP-25-deficient mouse mutant. *Pharmacol Biochem Behav*, 68(4):669–76.
- von Kanel T, Stanke F, Weber M, Schaller A, Racine J, Kraemer R, Chanson M, Tümmler B, Gallati S (2013) Clinical and molecular characterization of the potential CF disease modifier syntaxin 1A. *Eur J Hum Genet*, 21(12):1462–6.
- Kaplan G & Newcorn JH (2011) Pharmacotherapy for Child and Adolescent Attention-deficit Hyperactivity Disorder. *Pediatr Clin North Am*, 58(1):99–120
- Karam RG, Bau CH, Salgado CA, Kalil KL, Victor MM, Sousa NO, Vitola ES, Picon FA, Zeni GD, Rohde LA et al (2009) Late-onset ADHD in adults: Milder, but still dysfunctional. *J Psychiatr Res*, 43(7):697–701.
- Kawashima K, Kishi T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Takahashi N, Saito S, Ohi K, Yasuda Y et al (2008) No association between tagging SNPs of SNARE complex genes (STX1A, VAMP2 and SNAP25) and schizophrenia in a Japanese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 147B(7):1327–31.
- Kenar ANI, Ay Oİ, Herken H, Erdal ME (2014) Association of VAMP-2 and Syntaxin 1A Genes with Adult Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Psychiatry Investig*, 11(1):76–83.
- Kendler KS & Myers J (2014) The boundaries of the internalizing and externalizing genetic spectra in men and women. *Psychol Med*, 44(3):647–55.
- Kessler RC, Adler L, Barkley R, Biederman J, Conners CK, Demler O, Faraone SV, Greenhill LL, Howes MJ, Secnik K et al (2006) The prevalence and correlates of adult ADHD in the United States: results from the National Comorbidity Survey Replication. *Am J Psychiatry*. 163(4):716–23.
- Kieling C, Kieling RR, Rohde LA, Frick PJ, Moffitt T, Nigg JT, Tannock R, Castellanos FX (2010) The age at onset of attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* 167(1):14–6.

- Kim-Cohen J, Caspi A, Moffitt TE, Harrington H, Milne BJ, Poulton R (2003) Prior Juvenile Diagnoses in Adults With Mental Disorder. *Arch Gen Psychiatry* 60(7):709-17.
- Kimura K, Mizoguchi A & Ide C (2003) Regulation of growth cone extension by SNARE proteins. *J Histochem Cytochem*, 51(4):429–33.
- Kooij JS, Boonstra AM, Vermeulen SH, Heister AG, Burger H, Buitelaar JK, 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):201–8.
- Krueger RF, Hicks BM, Patrick CJ, Carlson SR, Iacono WG, McGue M (2002) Etiologic connections among substance dependence, antisocial behavior, and personality: modeling the externalizing spectrum. *J Abnorm Psychol*, 111(3):411–24.
- Krueger RF, Markon KE, Patrick CJ, Iacono WG (2005) Externalizing psychopathology in adulthood: A dimensional-spectrum conceptualization and its implications for DSM-V. *J Abnorm Psychol*, 114(4): 537–50.
- Kustanovich V, Merriman B, McGough J, McCracken JT, Smalley SL, Nelson SF (2003) Biased paternal transmission of SNAP-25 risk alleles in attention-deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*, 8(3):309–15.
- Lasky-Su J, Neale BM, Franke B, Anney RJ, Zhou K, Maller JB, Vasquez AA, Chen W, Asherson P, Buitelaar J et al (2008). *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 147(8):1345–54.
- Lasky-Su J, Anney RJ, Neale BM, Franke B, Zhou K, Maller JB, Vasquez AA, Chen W, Asherson P, Buitelaar J, Banaschewski T et al (2008). Genome-wide association scan of the time to onset of Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 147B(8):1355-8.
- Lee KH, Kim MY, Kim DH, Lee YS (2004) Syntaxin 1A and receptor for activated C kinase interact with the N-terminal region of human dopamine transporter. *Neurochem Res*, 29(7):1405–9.
- Lesch KP, Timmesfeld N, Renner TJ, Halperin R, Röser C, Nguyen TT, Craig DW, Romanos J, Heine M, Meyer J et al (2008) Molecular genetics of adult ADHD: converging evidence from genome-wide association and extended pedigree linkage studies. *J Neural Transm*, 115(11):1573–85.
- Lin YJ, Yang LK & Gau SSF (2015) Psychiatric comorbidities of adults with early- and late-onset attention-deficit/hyperactivity disorder. *Aust N Z J Psychiatry*, pii: 0004867415609423. [Epub ahead of print]
- Liu J (2004) Childhood externalizing behavior: theory and implications. *J Child Adolesc Psychiatr Nurs*, 17(3):93–103.

- Loe IM & Feldman HM (2007) Academic and educational outcomes of children with ADHD. *J Pediatr Psychol*, 32(6), pp.643–654.
- Malenfant P, Liu X, Hudson ML, Qiao Y, Hrynychak M, Riendeau N, Hildebrand MJ, Cohen IL, Chudley AE, Forster-Gibson C et al (2012) Association of GTF2i in the Williams-Beuren Syndrome critical region with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*, 42(7):1459–69.
- Martinez AF, Muenke M. & Arcos-Burgos M (2011) From the black widow spider to human behavior: Latrophilins, a relatively unknown class of G protein-coupled receptors, are implicated in psychiatric disorders. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 156B(1):1–10.
- Matthies S, Philipsen, A & Svaldi J (2012) Risky decision making in adults with ADHD. *J Behav Ther Exp Psychiatry*.43(3):938–46.
- McGue M, Iacono WG, Legrand LN, Malone S, Elkins I (2001) Origins and consequences of age at first drink. I. Associations with substance-use disorders, disinhibitory behavior and psychopathology, and P3 amplitude. *Alcohol Clin Exp Res* 25(8):1156–65.
- Mick E, Todorov A, Smalley S, Hu X, Loo S, Todd RD, Biederman J, Byrne D, Dechairo B, Guiney A, McCracken J et al (2010) Family Based Genome-Wide Association Scan of Attention -Deficit/Hyperactivity Disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 49(9):898–905.
- Mill J, Curran S, Kent L, Gould A, Hockett L, Richards S, Taylor E, Asherson P (2002) Association study of a SNAP-25 microsatellite and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet*, 114(3):269–71.
- Mill J, Richards S, Knight J, Curran S, Taylor E, Asherson P (2004) Haplotype analysis of SNAP-25 suggests a role in the aetiology of ADHD. *Mol Psychiatry*, 9(8):801–10.
- Mill J, Xu X, Ronald A, Curran S, Price T, Knight J, Craig I, Sham P, Plomin R, Asherson P. 2005. Quantitative trait locus analysis of candidate gene alleles associated with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in five genes:DRD4, DAT1, DRD5, SNAP-25, and5HT1B. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 133B(1):68–73.
- Moffitt TE, Houts R, Asherson P, Belsky DW, Corcoran DL, Hammerle M, Harrington H, Hogan S, Meier MH, Polanczyk GV et al (2015) Is Adult ADHD a Childhood-Onset Neurodevelopmental Disorder? Evidence From a Four-Decade Longitudinal Cohort Study. *Am J Psychiatry*, 172(10):967-77.
- Mohrmann R, de Wit H, Connell E, Pinheiro PS, Leese C, Bruns D, Davletov B, Verhage M, Sørensen JB (2013) Synaptotagmin interaction with SNAP-25 governs vesicle docking, priming, and fusion triggering. *J Neurosci*, 33(36):14417–30.

- Morrison JR & Stewart MA (1971) A family study of the hyperactive child syndrome. *Biol Psychiatry*, 3(3), pp.189–195.
- Mota, NR, Rovaris DL, Kappel DB, Picon FA, Vitola ES, Salgado CA, Karam RG, Rohde LA, Grevet EH, Bau CH (2015) NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2 gene cluster and the clinical and genetic heterogeneity of adults with ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 18 [Epub ahead of print].
- Mothet JP, Pollegioni L, Ouanounou G, Martineau M, Fossier P, Baux G (2005) Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(15):5606–11.
- Mulle JG, Pulver AE, McGrath JA, Wolyniec PS, Dodd AF, Cutler DJ, Sebat J, Malhotra D, Nestadt G, Conrad DF et al (2014) Reciprocal Duplication of the Williams-Beuren Syndrome Deletion on Chromosome 7q11.23 Is Associated with Schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 75(5):371–7.
- Murphy K. & Barkley RA(1996) Attention deficit hyperactivity disorder adults: comorbidities and adaptive impairments. *Compr Psychiatry*, 37(6):393–401.
- Nakamura K Anitha A, Yamada K, Tsujii M, Iwayama Y, Hattori E, Toyota T, Suda S, Takei N, Iwata Y et al (2008) Genetic and expression analyses reveal elevated expression of syntaxin 1A (STX1A) in high functioning autism. *Int J Neuropsychopharmacol*, 11(08):1073-84.
- Nakamura K, Iwata Y, Anitha A, Miyachi T, Toyota T, Yamada S, Tsujii M, Tsuchiya KJ, Iwayama Y, Yamada K et al (2011) Replication study of Japanese cohorts supports the role of STX1A in autism susceptibility. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 35(2):454–8.
- Neale BM, Lasky-Su J, Anney R, Franke B, Zhou K, Maller JB, Vasquez AA, Asherson P, Chen W, Banaschewski T et al (2008) Genome-wide association scan of attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 147B(8):1337–44
- Neale BM, Medland S, Ripke S, Anney RJ, Asherson P, Buitelaar J, Franke B, Gill M, Kent L, Holmans P et al (2010) Case-control genome-wide association study of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 49(9):906-20.
- Noordermeer SD, Luman M, Buitelaar JK, Hartman CA, Hoekstra PJ, Franke B, Faraone SV, Heslenfeld DJ, Oosterlaan J (2015) Neurocognitive Deficits in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder With and Without Comorbid Oppositional Defiant Disorder. *J Atten Disord*, pii: 1087054715606216. [Epub ahead of print]
- Olgiate P, Mandelli L, Alberti S, Lia L, Serretti A, Tiwari AK, Jain U, Kennedy JL, Müller DJ (2014) Role of synaptosome-related (SNARE) genes in adults with attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatry Res*, 215(3):799–800.

- Parpura V & Zorec R (2010) Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Res Rev*, 63(1-2):83–92.
- Parpura V, Baker BJ, Jeras M, Zorec R (2010) Regulated exocytosis in astrocytic signal integration. *Neurochem Int*, 57(4), pp.451–459.
- Polanczyk G, Caspi A, Houts R, Kollins SH, Rohde LA, Moffitt TE (2010) Implications of extending the ADHD age-of-onset criterion to age 12: results from a prospectively studied birth cohort. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 49(3):210–6.
- Polanczyk GV, Willcutt EG, Salum GA, Kieling C, Rohde LA (2014) ADHD prevalence estimates across three decades: An updated systematic review and meta-regression analysis. *Int J Epidemiol*, 43(2): 434–42.
- Quick MW (2006) The role of SNARE proteins in trafficking and function of neurotransmitter transporters. *Handb Exp Pharmacol*, 175:181–96.
- Raptis A, Torrejón-Escribano B, Gómez de Aranda I, Blasi J (2005) Distribution of synaptobrevin/VAMP 1 and 2 in rat brain. *J Chem Neuroanat*, 30(4):201–11.
- Renner TJ, Walitza S, Dempfle A, Eckert L, Romanos M, Gerlach M, Schäfer H, Warnke A, Lesch KP, Jacob C (2008) Allelic variants of SNAP25 in a family-based sample of ADHD. *J Neural Transm*, 115:317–21.
- Robbins T, Curran H, de Wit H (2012) Special issue on impulsivity and compulsivity. *Psychopharmacology*, 219(2):251–2.
- Roberts JL, Hovanes K, Dasouki M, Manzardo AM, Butler MG (2014) Chromosomal microarray analysis of consecutive individuals with autism spectrum disorders or learning disability presenting for genetic services. *Gene*, 535(1):70–8.
- Sánchez-Mora C, Cormand B, Ramos-Quiroga JA, Hervás A, Bosch R, Palomar G, Nogueira M, Gómez-Barros N, Richarte V, Corrales M et al (2013) Evaluation of common variants in 16 genes involved in the regulation of neurotransmitter release in ADHD. *Eur Neuropsychopharmacol*, 23(6):426–35.
- Sarkar K, Bhaduri N, Ghosh P, Sinha S, Ray A, Chatterjee A, Mukhopadhyay K (2012) Role of SNAP25 explored in eastern Indian attention deficit hyperactivity disorder probands. *Neurochem Res*, 37(2):349–57.
- Scheel-Krüger J (1971) Comparative studies of various amphetamine analogues demonstrating different interactions with the metabolism of the catecholamines in the brain. *Eur J Pharmacol*, 14(1):47–59.
- Schoch S, Deák F, Königstorfer A, Mozhayeva M, Sara Y, Südhof TC, Kavalali ET (2001) SNARE Function Analyzed in Synaptobrevin/VAMP Knockout Mice. *Science*,

294(5544):1117–22.

- Sher KJ & Trull TJ (1994) Personality and disinhibitory psychopathology: alcoholism and antisocial personality disorder. *J Abnorm Psychol*, 103(1):92–102.
- Shirasu M, Kimura K, Kataoka M, Takahashi M, Okajima S, Kawaguchi S, Hirasawa Y, Ide C, Mizoguchi A (2000) VAMP-2 promotes neurite elongation and SNAP-25A increases neurite sprouting in PC12 cells. *Neurosci Res*, 37(4): 265–75.
- Simon V, Czobor P, Bálint S, Mészáros A, Bitter I (2009) Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis. *Br J Psychiatry*, 194(3):204–11.
- Sobanski E (2006) Psychiatric comorbidity in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 256:26–31.
- Soendergaard HM, Thomsen PH, Pedersen P, Pedersen E, Poulsen AE, Nielsen JM, Winther L, Henriksen A, Rungoe B, Soegaard HJ (2015) Education, occupation and risk-taking behaviour among adults with attention-deficit / hyperactivity disorder. *Dan Med J*, 61(3): pii: A5032.
- Söllner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH, Rothman JE (1993) A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*, 75(3):409–18.
- Stergiakouli E, Hamshere M, Holmans P, Langley K, Zaharieva I; deCODE Genetics; Psychiatric GWAS Consortium, Hawi Z, Kent L, Gill M et al (2012) Investigating the contribution of common genetic variants to the risk and pathogenesis of ADHD. *Am J Psychiatry*, 169(2):186–94.
- Südhof TC (1995) The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature*, 375(6533):645–53.
- Südhof TC (2002) Synaptotagmins: Why So Many? *J Biol Chem*, 277(10):7629–32.
- Südhof TC (2004) The Synaptic Vesicle Cycle. *Annu Rev Neurosci*, 27(1):509–47.
- Südhof TC (2013) Neurotransmitter release: The last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*, 80(3):675–90.
- Sulzer D, Chen TK, Lau YY, Kristensen H, Rayport S, Ewing A (1995) Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport. *J Neurosci*, 15(5 Pt 2):4102–8.

- Sulzer D, Sonders MS, Poulsen NW, Galli A (2005) Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: A review. *Prog Neurobiol*, 75(6):406–33.
- Thapar A, Harrington R & McGuffin P (2001). Examining the comorbidity of ADHD-related behaviours and conduct problems using a twin study design. *Br J Psychiatry*, 179:224–9.
- Tordjman S, Anderson GM, Cohen D, Kermarrec S, Carlier M, Touitou Y, Saugier-veber P, Lagneaux C, Chevreuil C, Verloes A (2013) Presence of autism, hyperserotonemia, and severe expressive language impairment in Williams-Beuren syndrome. *Mol Autism*, 4(1):29.
- Trus M, Wiser O, Goodnough MC, Atlas D 2001. The transmembrane domain of syntaxin 1A negatively regulates voltage-sensitive Ca(2+) channels. *Neuroscience*, 104(2):599–607.
- Vitola ES, Salgado CA, Silva KL, Karam RG, Victor MM, Mota NR, Contini V, Picon FA, Guimarães-da-Silva PO, Giordani RS et al (2012) The role of a lifetime history of oppositional defiant and conduct disorders in adults with ADHD: implications for clinical practice. *CNS Spectr*, 17(2):94–9.
- Wang CT, Grishanin R, Earles CA, Chang PY, Martin TF, Chapman ER, Jackson MB (2001) Synaptotagmin modulation of fusion pore kinetics in regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Science*, 294(5544):1111–5.
- Wigal SB (2009) Efficacy and safety limitations of attention-deficit hyperactivity disorder pharmacotherapy in children and adults. *CNS Drugs*, 23(SUPPL. 1):21–31.
- Wiser O, Bennett MK, Atlas D (1996) Functional interaction of syntaxin and SNAP-25 with voltage-sensitive L- and N-type Ca²⁺ channels. *EMBO J*, 15(16):4100–10.
- Wong AH, Trakalo J, Likhodi O, Yusuf M, Macedo A, Azevedo MH, Klempan T, Pato MT, Honer WG, Pato CN (2004) Association between schizophrenia and the syntaxin 1A gene. *Biol Psychiatry*, 56(1):24–9.
- Young Stallings MC, Corley RP, Krauter KS, Hewitt JK (2000) Genetic and Environmental Influences on Behavioral Disinhibition. *Am J Med Genet*, 96(5):684–95.
- Young SE, Friedman NP, Miyake A, Willcutt EG, Corley RP, Haberstick BC, Hewitt JK (2009) Behavioral Disinhibition: Liability for Externalizing Spectrum Disorders and Its Genetic and Environmental Relation to Response Inhibition Across Adolescence. *J Abnorm Psychol*, 118(1):117–30.
- Zayats T, Athanasiu L, Sonderby I, Djurovic S, Westlye LT, Tamnes CK, Fladby T, Aase H, Zeiner P, Reichborn-Kjennerud T et al (2015) Genome-Wide Analysis of Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Norway. *PLoS One*, 10(4): p.e0122501.

- Zhang D, Cheng L, Badner JA, Chen C, Chen Q, Luo W, Craig DW, Redman M, Gershon ES, Liu C (2010) Genetic Control of Individual Differences in Gene-Specific Methylation in Human Brain. *Am J Hum Genet*, 86(3):411-9.
- Zhang H, Zhu S, Zhu Y, Chen J, Zhang G, Chang H (2011) An association study between SNAP-25 gene and attention-deficit hyperactivity disorder. *Eur J Paediatr Neurol*, 15(1):48–52.
- Zhang Q, Pangrsic T, Kreft M, Krzan M, Li N, Sul JY, Halassa M, Van Bockstaele E, Zorec R, Haydon PG (2004) Fusion-related Release of Glutamate from Astrocytes. *J Biol Chem*, 279(13):12724–33.

6. Anexos

Produção científica durante o mestrado

Artigo pré-aceito na revista Journal of Psychiatric Research

Fator de Impacto: 3.957 (2014)

***NOS1* and *SNAP25* polymorphisms are associated with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder symptoms in adults but not in children**

Angélica Salatino-Oliveira^a, Glauca C. Akutagava-Martins^a, Estela M. Bruxel^a, Julia P. Genro^a, Guilherme V. Polanczyk^{b,c}, Cristian Zeni^d, Christian Kieling^{d,e}, Rafael G. Karam^f, Diego L. Rovaris^{a,f}, Verônica Contini^{a,f}, **Renata B. Cupertino**^{a,f}, Nina R. Mota^{a,f}, Eugenio H Grevet^{e,f}, Claiton H. Bau^{a,f}, Luis A. Rohde^{c,d,e}, Mara H. Hutz^a

^a Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil;

^b Department of Psychiatry, Universidade de São Paulo, Brazil;

^c Institute for Developmental Psychiatry for Children and Adolescents;

^d Division of Child and Adolescent Psychiatry, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil;

^e Department of Psychiatry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil;

^f Adult ADHD Outpatient Program, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

Correspondence to:

Prof. Mara H. Hutz - Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS.

Caixa Postal (Box number) 15053; CEP (Zip Code): 91501-970- Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: 55-51-3308-6720; FAX: 55-51-3308-7311;

E-mail: mara.hutz@ufrgs.br

ABSTRACT

Several investigations documented that Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) is better conceptualized as a dimensional disorder. At the same time, the disorder seems to have different neurobiological underpinnings and phenotypic presentation in children compared to adults. Neurodevelopmental genes could explain, at least partly these differences. The aim of the present study was to examine possible associations between polymorphisms in *SNAP25*, *MAP1B* and *NOS1* genes and ADHD symptoms in Brazilian samples of children/adolescents and adults with ADHD. The youth sample consisted of 301 patients whereas the adult sample comprises 485 individuals with ADHD. Diagnoses of ADHD and comorbidities were based on the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – 4th edition criteria. The Swanson, Nolan and Pelham Scale-Version IV (SNAP-IV) was applied by psychiatrists blinded to genotype. The total SNAP-IV scores were compared between genotypes. Impulsivity SNAP-IV scores were also compared according to *NOS1* genotypes. Adult patients homozygous for the C allele at *SNAP25 rs8636* showed significantly higher total SNAP-IV scores ($F = 11.215$; adjusted P -value = 0.004). Impulsivity SNAP-IV scores were also significantly different according to *NOS1 rs478597* polymorphisms in adults with ADHD ($F = 6.282$; adjusted P -value = 0.026). These associations were not observed in children and adolescents with ADHD. These results suggest that *SNAP25* and *NOS1* genotypes influence ADHD symptoms only in adults with ADHD. Our study corroborates previous evidences for differences in the genetic contribution to adult ADHD compared with childhood ADHD.

Keywords: Neurodevelopmental genes; ADHD symptoms; impulsivity.

Aprovação do comitê de ética do HCPA



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

RESOLUÇÃO

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

Projeto: 01-321

Versão do Projeto: 22/01/2002

Versão do TCLE: 22/01/2002

Pesquisadores:

PAULO SILVA BELMONTE DE ABREU

CLAITON H. O. BAU

EUGENIO GREVET

CARLOS ALBERTO IGLESIAS SALGADO

BETINA CHAIT

Título: ESTUDO DAS BASES MOLECULARES DO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO/HIPERATIVIDADE EM ADULTOS

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

Por pertencer a uma área temática especial este projeto somente poderá ser iniciado após a sua aprovação pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Porto Alegre, 25 de janeiro de 2002.

Prof. Themis Reverbil da Silveira
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA