

Universidade Federal do Rio Grande Do Sul
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**EVIDÊNCIAS E IMPLICAÇÕES DE EFEITOS EPISTÁTICOS E DE AGRUPAMENTO
GÊNICO EM UM CONJUNTO DE TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS**

Nina Roth Mota

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

Orientador: Prof. Dr. Claiton Henrique Dotto Bau

Porto Alegre, junho de 2013

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

As pesquisas foram realizadas no Laboratório de Genética Humana Molecular do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e foram subvencionadas pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto do Milênio, Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX, Brasil) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS–DECIT/PPSUS, Brasil). A aluna recebeu bolsa de estudos concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) durante a maior parte de seu doutorado e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) durante o seu estágio de Doutorado-Sanduíche no Exterior.

Parte da presente Tese foi desenvolvida no Instituto de Psiquiatria do King's College London, sob supervisão do Prof. Dr. Philip Asherson.

*"Another turning point
a fork stuck in the road
Time grabs you by the wrist
directs you where to go
So make the best of this test
and don't ask why
It's not a question
but a lesson learned in time*

*It's something unpredictable
but in the end it's right
I hope you had the time of your life..."*

(Time of Your Life - Green Day)

“Brindo À Casa, Brindo À Vida, Meus Amores, Minha Família”

(Mar de Gente - O Rappa)

AGRADECIMENTOS

“Na minha memória –já tão congestionada – e no meu coração – tão cheio de marcas e poços – você ocupa um dos lugares mais bonitos”

(Caio Fernando de Abreu)

Ao meu orientador, Professor Claiton Bau, que prontamente abriu as portas de seu laboratório e me apresentou o instigante mundo da pesquisa em genética psiquiátrica. Nos últimos quatro anos, além de me orientar com empenho e dedicação exemplares, ele deu liberdade e incentivo para a criação de novas ideias, abordagens e colaborações com outros grupos de pesquisa. Meu sincero MUITO OBRIGADA pela orientação e apoio incondicional, por se fazer um orientador presente mesmo a 10.348km de distância, pela amizade, pela paciência e por estar sempre disposto a embarcar nas mais diversas discussões filosóficas e metodológicas sobre a ciência e sobre a vida. A sua imensa paixão e dedicação pela ciência são um grande exemplo a ser seguido.

Ao professor Philip Asherson, do King’s College London, por ter me recebido em seu grupo durante o meu doutorado sanduíche, dando a oportunidade de eu expandir muito meus horizontes, tanto profissionais quanto pessoais.

À professora Sidia Callegari-Jacques por ter disponibilizados todos os seus conhecimentos estatísticos e embarcado com a gente na grande aventura de desvendar o mundo das interações epistáticas. À professora Maria Cátira Bortolini por toda a orientação e ensinamentos que tornaram a abordagem evolutiva do complexo gênico estudado e a redação do artigo correspondente muito interessantes e produtivas. À professora Mara Hutz pelo carinho e colo oferecido em Hamburgo quando a saudade de todo o “povo do PPGBM” já estava pesando.

Ao PPGBM, por reforçar que é preciso ter orgulho de estar entre os melhores programas de pós-graduação do país e força de vontade e trabalho pra se manter em tal posição e pelo incentivo e receptividade a todos os alunos. Em especial ao Elmo, pelo exemplo de profissionalismo, competência e dedicação e por estar sempre disposto a socorrer nos momentos de crise.

Aos colegas e amigos da Sala 109 – Diego, Verônica, Guilherme, Evelise, Lucas, Jaqueline, Renata – pela colaboração científica e pelos muitos momentos de

descontração. Obrigada pela parceria e pela amizade que vão muito além do ambiente científico! Também a todos os colegas dos Laboratórios 114 e 116, pelos momentos de diversão e pela cooperação nos estudos. Em especial ao Vinícius e à Luciana, pela amizade, risadas e bate-papos.

Às meninas da genética humana “das antigas”, Vê, Julinha e Tati, que me receberam de braços abertos em 2009 e fizeram eu me sentir “em casa” desde o início; pelos auxílios científicos, pelas viagens, festinhas e jantinhas e, principalmente, por tornarem-se grandes amigas;

Ao Diego, com o qual não heteromerizo, mas certamente há um grande efeito epistático nas nossas interações; pela amizade capaz de tornar leves e divertidas as incontáveis horas que passamos investigando interações gene-gene, além das outras tantas horas de papos-furados.

Ao Gui, pela parceria nas coletas do grupo controle, nas cervejas e nas risadas e por estar sempre disposto a ajudar no que for preciso.

À Vanessa e ao Eli, que encararam comigo a missão exploratória da interface evolução-psiquiatria, pela paciência e por tornarem esta jornada muito mais prazerosa e produtiva.

Aos colegas e amigos do PRODAH de adultos por permitirem que eu fizesse parte dessa incrível família do PRODAH-A; pelos impagáveis momentos de diversão e por me ensinarem muito sobre os encantos do mundo da psiquiatria.

Em especial ao Eugênio, por acreditar em mim e pelos incentivos que tiveram um grande efeito nessa jornada; ao Mestre Vitola, pela paciência de me ensinar tantos conceitos psiquiátricos e pela parceria na obtenção da amostra de controles; ao Picon, por estar sempre disposto a ajudar, seja em setores tecnológicos, farmacológicos ou simplesmente propiciando momentos de descontração; à Katiane, pela risadas, festinhas, viagens, aventuras, parceria na academia, enfim, pela grande amizade.

Por fim, agradeço também às pessoas que adotaram e contribuíram para a realização deste Doutorado, algumas vezes sem nem saber direito do que essa tal genética psiquiátrica trata:

Aos meus pais, meus maiores exemplos de vida, minha grande fonte de inspiração, impossível colocar em palavras tamanho sentimento de gratidão, de admiração e de amor que eu sinto por vocês; pelo amor incondicional, pelo suporte, pelo apoio, por acreditarem sempre em mim e por terem permitido que eu fosse uma criança

questionadora, que não aceitava a resposta mais simples nem o caminho mais fácil como o correto. Tenho certeza de que na infância já estavam os primórdios do meu desejo de ser uma pesquisadora.

Aos meus avós Ives e Marina, meu ninho seguro, pelo carinho, pelo incentivo à busca do meu sonho, por se fazerem constantemente presentes, por perdoarem meus períodos de “sumiço” e compreenderem que apesar da falta do convívio do dia-a-dia, os corações estão sempre batendo na mesma sintonia.

Aos Tios, Primos e Agregados Weissheimer, por reforçarem os laços familiares e nunca deixar dúvida de que a base da força para enfrentar o mundo e conquistar nossos objetivos é a família. Em especial, à minha Dinda Liane, tio Renato, Dudu e Guga, por fazerem da casa deles a extensão da minha, mesmo que a presença física lá tenha sido muito menos frequente do que eu gostaria.

Aos meus avós paternos, João (*in memoriam*) e Alice, e à tia Sandra e família, que mesmo de longe, sempre me incentivaram e acreditaram em mim.

À Priscilinha, minha irmã de coração, pela amizade inestimável a mais de 17 anos, por dividir comigo as angústias e conquistas ao longo desses anos e por sempre, sempre me apoiar e incentivar.

Aos amigos de Londres, Lika, Teno, Fê, Diego, Juju e Rosi, por tornarem maravilhoso o período que passei lá, pela parceria, conversas, risadas e pela incrível amizade. Ao “tios londrinos” Luiz Fábio, Cláudia, Maria e Teresa pela grande amizade e por abrirem suas casas para mim e minha família sempre. À Aninha, minha vizinha querida - quase londrina, e Tiago, pelas inestimáveis ajudas e mimos do dia-a-dia.

Ao Fausto, que entrou nessa empreitada aos 45 min do segundo tempo, mas que teve um papel fundamental na manutenção da minha sanidade mental durante a elaboração da presente Tese.

À Dharma Beatriz, minha fiel companheira canina por 13 anos, pelo amor incondicional; sinto muito ter te deixado, mas foi preciso ir atrás deste sonho que me ajudaste a construir.

Finalmente, a todos que, embora não estejam citados, de uma forma ou de outra, de perto ou de longe, fazem parte de minha vida e me incentivaram na busca desta conquista.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	10
RESUMO	11
ABSTRACT	13
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO	15
1. TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS.....	16
1.1 Transtorno por Uso de Álcool.....	19
1.2 Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH).....	23
1.3 Transtorno de Conduta (TC).....	28
1.4 Dimensões de Personalidade.....	30
1.5 O Papel Central do Sistema Dopaminérgico.....	33
2. ESTUDOS MOLECULARES.....	35
2.1 O Tradicional Receptor de Dopamina D2 (<i>DRD2</i>).....	37
2.2 Efeitos Epistáticos e o Papel da Heteromerização.....	43
2.2.1 Efeitos Epistáticos.....	43
2.2.1 Receptores de Dopamina D2 e D4: Heteromerização e Epistasia.....	47
2.3 O Complexo Gênico NTAD (<i>NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2</i>).....	52
2.3.1 Características Individuais Dos Genes Do NTAD.....	54
· <i>Neural Cell Adhesion Molecule 1 (NCAM1)</i>	54
· <i>Tetratricopeptide Repeat Domain 12 (TTC12)</i>	55
· <i>Ankyrin Repeat and Kinase Domains containing 1 (ANKK1)</i>	57
· <i>Dopamine Receptor D2 (DRD2)</i> – Informações Adicionais.....	58
2.3.2 O NTAD como Unidade Funcional.....	60

CAPÍTULO 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	63
Justificativa	64
Objetivos	65
CAPÍTULO 3. DRD2/DRD4 HETEROMERIZATION MAY INFLUENCE GENETIC SUSCEPTIBILITY TO ALCOHOL DEPENDENCE	66
CAPÍTULO 4. ASSOCIATION BETWEEN DRD2/DRD4 INTERACTION AND CONDUCT DISORDER: A POTENTIAL DEVELOPMENTAL PATHWAY TO ALCOHOL DEPENDENCE	69
CAPÍTULO 5. LINKING DOPAMINE NEUROTRANSMISSION AND NEUROGENESIS: THE EVOLUTIONARY HISTORY OF THE NTAD (<i>NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2</i>) GENE CLUSTER..	74
CAPÍTULO 6. <i>NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2</i> GENE CLUSTER AND THE CLINICAL AND GENETIC HETEROGENEITY OF ADULT ADHD	89
CAPÍTULO 7. DISCUSSÃO GERAL	122
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
ANEXO I	162
ANEXO II	166
ANEXO III	174

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

<i>ANKK1</i>	Gene <i>Ankyrin Repeat and Kinase Domain 1</i>
<i>DRD2</i>	Gene <i>Dopamine Receptor D2</i>
<i>DRD4</i>	Gene <i>Dopamine Receptor D4</i>
D2S	Isoforma curta do receptor de dopamina D2
D2L	Isoforma longa do receptor de dopamina D2
DSM-IV-TR	Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais, 4ª Edição, Revisada
GWAS	Estudo de associação por varredura genômica
<i>NCAM1</i>	Gene <i>Neural Cell Adhesion Molecule 1</i>
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NTAD	Agrupamento gênico formado pelos genes <i>NCAM1</i> , <i>TTC12</i> , <i>ANKK1</i> e <i>DRD2</i>
OR	Razão de <i>odds</i> (<i>odds ratio</i>)
SNP	Polimorfismo de base única
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade
TDO	Transtorno Desafiador de Oposição
TPAS	Transtorno de Personalidade Anti-Social
<i>TTC12</i>	Gene <i>Tetratricopeptide Repeat Domain 12</i>
TUS	Transtorno por Uso de Substâncias
VNTR	Polimorfismo de número variável de repetições em tandem

RESUMO

Os transtornos psiquiátricos causam forte impacto na vida dos indivíduos afetados e da sociedade como um todo e há muitas evidências indicando um forte componente genético envolvido na susceptibilidade a esses transtornos. Nos últimos anos houve um grande avanço tecnológico e analítico na área da genética, permitindo investigações em larga escala por fatores específicos que compõem a grande herdabilidade das doenças mentais. No entanto, os estudos genéticos têm esbarrado em dificuldades vinculadas à natureza complexa desses fenótipos. A presente Tese sugere abordagens alternativas para superar tais barreiras e que podem auxiliar na identificação de mecanismos e alterações genéticas com papéis relevantes em um conjunto de fenótipos comportamentais relacionados. A partir da compilação de evidências bioquímicas, fisiológicas e evolutivas, bem como do reconhecido papel do sistema dopaminérgico na modulação comportamental, procuramos esclarecer o papel de efeitos epistáticos e de agrupamentos gênicos no desenvolvimento do Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH), Transtorno de Conduta (TC) e Transtorno por Uso de Álcool. Mais especificamente, identificamos uma interação entre variantes dos genes dos receptores de dopamina D2 (*DRD2*) e D4 (*DRD4*), a qual reflete padrões de heteromerização diferencial previamente demonstradas *in vitro* e *in vivo*, que exerce um papel importante na susceptibilidade ao Abuso/Dependência de Álcool. Além de identificarmos este efeito epistático em duas amostras independentes de adultos, em um estudo subsequente demonstramos que o efeito desta interação pode ser observado ainda na infância, estando associado com o desenvolvimento do TC em crianças com TDAH. Esses achados, além de esclarecerem associações controversas na literatura em relação ao papel dos genes *DRD2* e *DRD4* em fenótipos psiquiátricos, também sugerem um mecanismo potencial para a possível via causal que conecta a presença de TC na infância ao subsequente desenvolvimento do alcoolismo na vida adulta. Também

visando esclarecer muitos achados inconsistentes na literatura sobre o papel do *DRD2* em transtornos psiquiátricos, realizamos uma análise evolutiva do agrupamento gênico NTAD (*NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2*), o qual engloba o *DRD2*, além de um estudo que considerou os efeitos individuais e em conjunto de polimorfismos ao longo desta região. Os resultados obtidos indicam que o NTAD é um agrupamento gênico bastante antigo, o qual está sendo mantido com vizinhança gênica e sintonia conservadas desde a emergência dos vertebrados para o meio terrestre, provavelmente via mecanismos envolvidos em co-regulação. Além disso, esta concepção do NTAD como uma “unidade funcional” é corroborada por resultados indicando a presença de múltiplos polimorfismos ao longo dos quatro genes associados com fenótipos comportamentais relacionados. Os resultados da presente Tese apoiam a premissa de que abordagens analíticas que consideram evidências de interações entre genes candidatos em amostras com vasta caracterização fenotípica representam uma alternativa muito promissora para o entendimento da fisiopatologia dos transtornos mentais.

ABSTRACT

Psychiatric disorders are highly heritable diseases that cause a major impact in the lives of the affected individuals, as well as to the society as a whole. In the last few years, extensive technological advances have been achieved in genetics research, allowing the performance of high-throughput analysis searching for specific genetic risk factors for psychiatric disorders. These studies, however, have encountered difficulties probably associated with the complexity of such phenotypes. This Thesis presents alternative approaches to deal with such difficulties and that may help in the identification of biological mechanisms and genetic variations affecting a group of related psychiatric phenotypes. Based on biochemical, biological and from comparative genomics, as well as on the known central role of dopaminergic system in behavioural outcomes, we sought to investigate the role of epistatic effects and genetic clustering in the susceptibility to Attention Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD), Conduct Disorder (CD) and Alcohol Dependence. More specifically, we identified epistatic interaction between DRD2 and DRD4 gene variants, which probably reflect different heteromerization patterns previously revealed by *in vitro* and *in vivo* experiments, associated with Alcohol Dependence in two independent adult samples (Mota et al., 2013). Further studies allowed us to show that such epistatic effects are manifested early in life since this interaction was also associated with CD susceptibility among ADHD children (Mota et al., *in press*). These finding shed light into the inconsistencies found in the literature regarding the effects of the DRD2 in psychiatry and also suggest a potential mechanism of a possible causal pathway linking CD in childhood and the emergence of Alcohol Dependence in adulthood. Other attempts to clear such inconsistencies were made by taking an evolutionary approach in the analysis of the NTAD (*NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2*) gene cluster and by analysing the effects of polymorphisms in these genes, both individually and in haplotypes, with psychiatric phenotypes. We were able to show

that the NTAD reflects an ancient cluster, which has been maintained with conserved neighbourhood and synteny since the emergence of vertebrate from the seas, probably with an important role of co-regulatory mechanisms (Mota et al., 2012). Furthermore, this idea of approaching the NTAD as a “functional cluster” is also supported by our results showing multiple polymorphisms along this cluster having independent effects on the same or relates psychiatric phenotypes. Overall, this Thesis supports that considering the epistatic effects and gene clustering in fully characterized samples of phenotypes represent promising approaches to better understand the physiopathology of psychiatric disorders.

1

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

“...Ignorance more frequently begets confidence than does knowledge: it is those who know little, and not those who know much, who so positively assert that this or that problem will never be solved by science.”

Charles Darwin (1809-1882)

1. TRANSTORNOS PSIQUIÁTRICOS

Os transtornos psiquiátricos causam sofrimento e comprometimento em diversos contextos na vida dos indivíduos afetados e de pessoas próximas, além de terem grande impacto social e econômico na sociedade como um todo. Ao passo em que grandes avanços foram conquistados nas últimas décadas a respeito da prevenção, diagnóstico e/ou tratamentos de outros tipos de doenças complexas, como cardiopatias, hepatopatias e mesmo câncer, o diagnóstico dos transtornos psiquiátricos permanece essencialmente clínico, sem contar com o auxílio de exames laboratoriais eficientes e o tratamento para esses transtornos persiste como um dos maiores enigmas da medicina.

Entretanto, grandes esforços têm sido implementados para melhor elucidar as bases etiológicas destes transtornos e muitos avanços têm sido alcançados neste sentido. Estudos clínicos e genéticos têm tradicionalmente subdividido os transtornos psiquiátricos comuns em duas categorias: Transtornos Internalizantes e Transtornos Externalizantes (Krueger 1999; Kendler et al., 2003; Cosgrove et al., 2011; Kessler et al., 2011; Roysamb et al., 2011).

A categoria *Internalizante*, a qual reflete a propensão de reagir ao descontentamento voltando o seu sofrimento para si próprio, é marcada por sintomas de ansiedade, medo e tristeza e inclui Transtornos Depressivos e Transtornos de Ansiedade.

Já a categoria *Externalizante* é descrita como a propensão de expressar descontentamento voltando-se contra o ambiente externo e costuma manifestar-se na forma de comportamentos de desobediência, agressivos e anti-sociais, e inclui o Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH), Transtorno Desafiador de Oposição (TDO), Transtorno de Conduta (TC), Transtorno de Personalidade Anti-Social (TPAS) e Transtornos por Uso de Substâncias (TUS). Evidências indicam que o desenvolvimento desses transtornos externalizantes compartilha mecanismos psicológicos, fisiopatológicos e de predisposição genética em comum (revisão em Arcos-Burgos et al., 2012).

Embora transtornos internalizantes e externalizantes conceitualmente representem categorias distintas (marcadas por forte correlação fenotípica, altas taxas de comorbidade e fatores de susceptibilidade genética compartilhados (Young et al., 2000; Kendler et al., 2003; Middeldorp et al., 2005; Kendler et al., 2007; Edwards e Kendler 2012)), frequentemente transtornos de ambas as classes são encontrados em comorbidade (Angold 1999; Burcusa et al., 2003; Kessler et al., 2006; Jacob et al., 2007; Cosgrove et al., 2011).

Há evidências indicando também uma parcela de sobreposição dos fatores genéticos que conferem susceptibilidade a essas duas categorias, ou seja, que existam fatores de risco compartilhados tanto por transtornos internalizantes quanto externalizantes (Cosgrove et al., 2011; Lahey et al., 2011). Cosgrove et al. (2011) sugerem que a frequente co-ocorrência de transtornos internalizantes e externalizantes possa ser explicada, em parte, pelo efeito de influências genéticas (62%) em comum.

Além disso, dimensões de personalidade também têm sido sugeridas como fatores de risco em comum que poderiam ser responsáveis pelas altas taxas de comorbidades dos transtornos psiquiátricos (Krueger et al., 2001; Khan et al., 2005; Hink et al., 2013). Foi sugerido também que essa correlação das dimensões de personalidade com diferentes transtornos (internalizantes ou externalizantes ou ambos) possa refletir, ao menos em parte, influências genéticas em comum (Young et al., 2000; Kendler et al., 2007; Tackett et al., 2011; Hink et al., 2013; Mikolajewski et al., 2013).

Ainda, grandes esforços vêm sendo implementados na tentativa de compreender melhor o curso de desenvolvimento dos transtornos psiquiátricos. Há um interesse crescente em desvendar como (e em que extensão) diferentes transtornos seriam capazes de predizer uns aos outros ao longo da vida. Estudos longitudinais têm mostrado que há um contínuo envolvendo os transtornos psiquiátricos que, iniciados durante a infância, podem persistir ao longo da vida não só por um padrão “homotípico” (persistência do mesmo transtorno), como também de maneira “heterotípica” (diferentes transtornos predizendo uns aos

outros ao longo do tempo) (Costello et al., 2003; Kim-Cohen et al., 2003; Kessler et al., 2011; Copeland et al., 2013).

Em um estudo retrospectivo abordando o poder preditivo das categorias internalizante e externalizante na manutenção e/ou desenvolvimento posterior de transtornos psiquiátricos, Kessler et al. (2011) encontraram associações mais fortes de predição de transtornos dentro de cada categoria (ou seja, padrão homotípico) do que entre as duas categorias (padrão heterotípico). No entanto, dentre predições heterotípicas, transtornos externalizantes prévios foram mais consistentemente preditores do aparecimento subsequente de transtornos internalizantes do que o inverso (transtornos internalizantes predizendo externalizantes) (Kessler et al., 2011). Resultado similar foi descrito por Kim-Cohen et al. (2003) em estudo prospectivo que indicou que a presença de TDO/TC na infância representava um dos mais importantes preditores tanto pra transtornos externalizantes como internalizantes.

Em estudo recente, Copeland et al. (2013) corroboram a idéia de que a presença de transtornos psiquiátricos na infância/adolescência seja um forte fator de risco para uma gama de transtornos na vida adulta. Dentre os achados mais interessantes estão a forte predição homotípica do TDAH ao longo do desenvolvimento e o efeito da presença de TDAH, TDO e TC na adolescência na predição de TUS na vida adulta (Copeland et al., 2013).

A seguir, será apresentada uma breve descrição dos transtornos psiquiátricos que fazem parte do foco central de estudos desta Tese. Dentre estes estão o Transtorno por Uso de Álcool (o qual é parte integrante do TUS), o TDAH e o TC. Além disso, uma menção à relevância de dimensões de personalidade e do sistema dopaminérgico a esses transtornos será apresentada.

1.1 Transtorno por Uso de Álcool

A seção de TUS da 4ª Edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais (DSM-IV-TR; American Psychiatric Association, 2000) inclui os Transtornos por Uso de Álcool, Nicotina, Cocaína, Opióides, entre outros. Em geral, o diagnóstico desses transtornos é subdividido em critérios para Abuso ou Dependência de determinada substância. Os critérios para diagnóstico de Transtorno por Uso de Álcool e de dois dos mais comuns Transtornos Induzidos pelo Álcool (Intoxicação com Álcool e Abstinência de Álcool) são apresentados na Tabela I.

Tabela I. Critérios Diagnósticos do Transtorno por Uso de Álcool e de Transtornos Induzidos pelo Álcool adaptado do DSM-IV-TR (APA, 2000).

Transtornos por Uso de Álcool

303.90 Dependência de Álcool

Um padrão mal adaptativo de uso de álcool, levando a comprometimento ou sofrimento clinicamente significativo, manifestado por três (ou mais) dos seguintes critérios, ocorrendo em qualquer momento no mesmo período de 12 meses:

- (1) tolerância, definida por qualquer um dos seguintes aspectos:
 - (a) necessidade de quantidades progressivamente maiores de álcool, para obter a intoxicação ou o efeito desejado
 - (b) acentuada redução do efeito com o uso continuado da mesma quantidade de álcool
- (2) abstinência, manifestada por qualquer dos seguintes aspectos:
 - (a) síndrome de abstinência característica de álcool (consultar os Critérios A e B dos conjuntos de critérios para Abstinência de Álcool)
 - (b) o álcool é consumido para aliviar ou evitar sintomas de abstinência
- (3) o álcool é frequentemente consumido em maiores quantidades ou por um período mais longo do que o pretendido
- (4) existe um desejo persistente ou esforços malsucedidos no sentido de reduzir ou controlar o uso de álcool
- (5) muito tempo é gasto em atividades necessárias para a obtenção do álcool, na utilização do álcool ou na recuperação de seus efeitos
- (6) importantes atividades sociais, ocupacionais ou recreativas são abandonadas ou reduzidas em virtude do uso de álcool
- (7) o consumo de álcool continua, apesar da consciência de ter um problema físico ou psicológico persistente ou recorrente que tende a ser causado ou exacerbado pelo álcool (p. ex., consumo continuado de bebidas alcoólicas, embora o indivíduo reconheça que uma úlcera piorou devido ao consumo do álcool)

305.00 Abuso de Álcool

A. Um padrão mal adaptativo de uso de álcool levando a prejuízo ou sofrimento clinicamente significativo manifestado por um (ou mais) dos seguintes aspectos, ocorrendo dentro de um período de 12 meses:

- (1) uso recorrente de álcool, acarretando fracasso em cumprir obrigações importantes no

trabalho, na escola ou em casa (p. ex., repetidas ausências ou fraco desempenho ocupacional relacionados ao uso de álcool; faltas, suspensões ou expulsões da escola relacionadas a utilização de álcool, negligência dos filhos ou dos afazeres domésticos)
(2) uso recorrente de álcool em situações nas quais isto representa perigo para a integridade física (p. ex., dirigir veículo ou operar máquina quando prejudicado pelo uso do álcool)
(3) problemas legais recorrentes relacionados ao álcool (p. ex., detenções por conduta desordeira relacionada ao álcool)
(4) uso continuado do álcool, apesar de problemas sociais ou interpessoais persistentes ou recorrentes causados ou exacerbados pelos efeitos deste (p. ex., discussões com o cônjuge acerca das consequências da intoxicação, lutas corporais)

B. Os sintomas jamais satisfizeram os critérios para Dependência de Álcool.

Transtornos Induzidos pelo Álcool

303.00 Intoxicação com Álcool

- A. Ingestão recente de álcool.
B. Alterações comportamentais ou psicológicas clinicamente significativas e mal adaptativas (p. ex., comportamento sexual ou agressivo inadequado, humor instável, prejuízo no julgamento, prejuízo no funcionamento social ou ocupacional) desenvolvidas durante ou logo após a ingestão de álcool.
C. Um ou mais dos seguintes sinais, desenvolvidos durante ou logo após o uso de álcool
(1) fala arrastada
(2) incoordenação
(3) marcha instável
(4) nistagmo
(5) comprometimento da atenção ou da memória
(6) estupor ou coma
D. Os sintomas não se devem a uma condição medica geral, nem são mais bem explicados por outro transtorno mental.

291.81 Abstinência de Álcool

- A. Cessação (ou redução) do uso pesado ou prolongado de álcool
B. Dois (ou mais) dos seguintes sintomas, desenvolvidos dentro de algumas horas a alguns dias após o Critério A:
(1) hiperatividade autonômica (p. ex., sudorese ou frequência cardíaca acima de 100)
(2) tremor intenso
(3) insônia
(4) náuseas ou vômitos
(5) alucinações ou ilusões visuais, táteis ou auditivas transitórias
(6) agitação psicomotora
(7) ansiedade
(8) convulsões de grande mal
C. Os sintomas no Critério B causam sofrimento ou prejuízo clinicamente significativo no funcionamento social, ocupacional ou em outras áreas importantes da vida do indivíduo.
D. Os sintomas não se devem a uma condição medica geral, nem são mais bem explicados por outro transtorno mental.
-

O consumo de bebidas que contém álcool, uma droga psicoativa que provoca efeitos relaxantes e eufóricos, está presente na maioria das culturas. Em geral, os efeitos por ingestão excessiva de álcool seguem um padrão temporal bifásico, caracterizado por uma sensação inicial de relaxamento e entusiasmo seguida de ressaca, exaustão e depressão. Quando ingerido em grandes quantidades pode também causar náusea, vômito, dificuldade/ incapacidade de controle físico,

perda de consciência e há risco de morte. A prevalência de Abuso/Dependência de Álcool (que durante a presente Tese poderá ser referido como sinônimo do Transtorno por Uso de Álcool) é estimada em torno de 13% (Kessler et al., 2005; Witkiewitz et al., 2013). Assim, embora as bebidas alcoólicas sejam de fácil acesso e seu consumo amplamente difundido na sociedade, apenas uma parcela dos indivíduos que ingerem álcool vem a ter problemas significantes relacionados a seu consumo. Esse fato torna interessante a busca pela identificação de fatores de risco que possam afetar a susceptibilidade individual ao Transtorno por uso de Álcool. Fatores genéticos, bem como a presença prévia ou simultânea de outros transtornos psiquiátricos, podem ser considerados como fortes candidatos na investigação de tais fatores de risco.

Estima-se que a contribuição genética para a variação da susceptibilidade ao Transtorno por Uso de Álcool seja em torno de 50-70% em ambos os sexos (revisão em Agrawal e Lynskey, 2008). É aceito na literatura que a suscetibilidade aos diferentes tipos de TUS possui uma base genética em comum (compartilhada entre os transtornos por uso de diferentes substâncias), além de fatores genéticos de risco que são substância-específicos (Kendler et al., 2007; Agrawal e Lynskey, 2008; Uhl et al., 2008; Palmer et al., 2012).

O sistema dopaminérgico tem um papel central na vulnerabilidade ao Abuso/Dependência de Álcool e outras substâncias de abuso, e assim, muitos estudos investigando o papel de variações genéticas relacionadas a esse sistema vêm sendo conduzidas. Essas informações serão detalhadas na Seção 1.5 – *O Papel Central do Sistema Dopaminérgico*, bem como na Seção 2 – *Estudos Moleculares* do presente Capítulo. Entretanto, embora seja consenso que fatores genéticos possuem uma forte influência na susceptibilidade ao Transtorno por Uso de Álcool e que o sistema dopaminérgico tenha um papel importante no TUS, a identificação desses fatores genéticos de risco não tem sido tão simples quanto se esperava.

Nos últimos anos, com a possibilidade de ampliação do volume de polimorfismos investigados, vários estudos de associação por varredura genômica (GWAS – do inglês *Genome-Wide Association Study*) foram conduzidos na

tentativa de identificar fatores genéticos associados à Dependência de Álcool (revisão em Kimura e Higuchi, 2011). Dentre os mais recentes, Bierut et al. (2010), contando com uma amostra de 1897 casos e 1932 controles, identificaram 15 polimorfismos de base única (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) associados à Dependência de Álcool com $P < 10^{-5}$, porém nenhum destes permaneceu significativamente associado ($P < 0.05$) na etapa de replicação do estudo. No mesmo ano, outro GWAS também não foi capaz de identificar associação significativa de SNPs pelos critérios convencionais de significância em GWAS; no entanto, os autores revelam que o sinal de associação mais forte foi obtido em uma região específica do Cromossomo 11 (Edenberg et al., 2010). Em uma análise subsequente através de uma abordagem gene-candidato, na qual 48 genes com evidência prévia de associação foram analisados, foi possível corroborar o papel de alguns desses genes na dependência de álcool, embora nenhum SNP tenha ultrapassado o valor de significância requerido por GWAS, (Kendler et al., 2011). Um desses genes candidatos associados (*ANKK1*) é foco de estudos da presente Tese e será descrito nas Seções 2.1 – *O Tradicional Receptor De Dopamina D2 (DRD2)* e 2.3 – *O Complexo Gênico NTAD (NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2)* do presente Capítulo.

O Transtorno por Uso de Álcool, bem como de outras substâncias, é normalmente precedido por uma gama de comportamentos de risco, característicos de transtornos externalizantes, durante a infância e adolescência. Um estudo indicou que quase $\frac{3}{4}$ dos adolescentes dependentes de álcool (com idades entre 13 e 17 anos) apresentavam diagnóstico para ao menos um outro transtorno externalizante (Kuperman et al., 2001). Os resultados de uma meta-análise recente indicam que a prevalência do TDAH é bastante elevada (23.1%) entre os indivíduos com TUS (Oortmerssen et al., 2012). Já em uma amostra de adultos internados em clínica de reabilitação devido ao TUS, 39% apresentavam diagnóstico para o TC (Schubiner et al., 2000).

A presença concomitante de TDAH em adultos com grave dependência de substâncias está associada a uma maior incidência de acidentes automobilísticos e, dentre as mulheres, a um aumento no número de tratamentos para o Abuso de Álcool (Schubiner et al., 2000). Da mesma forma, a presença de TC nesses

pacientes está associada a um início mais precoce do desenvolvimento da Dependência de Álcool, à maiores taxas de dependência de outras substâncias (cocaína, estimulantes, alucinógenos e/ou *cannabis*) e a um maior prejuízo social, acadêmico e profissional (Schubiner et al., 2000). Foi indicado também que tanto a presença de TC como de TDAH estavam associadas a uma idade mais precoce de experimentação com álcool (Sartor et al., 2007).

Embora tradicionalmente os estudos relacionados aos padrões etiológicos e de comorbidade do Abuso/Dependência de Álcool tenham focado primariamente em sintomas e transtornos externalizantes, é importante enfatizar que transtornos internalizantes também frequentemente co-ocorrem com o mesmo (Davis et al., 2006; Hasin et al., 2007; Blanco et al., 2013; Hamdi e Iacono 2013). Adolescentes com histórico de transtornos de ansiedade ou depressivos possuem risco aumentado de desenvolver Dependência de Álcool, bem como TUS em geral (Bruckl et al., 2007). Dentre adultos diagnosticados com Transtorno Depressivo Maior, dois grandes estudos indicaram que a presença concomitante do Transtorno por Uso de Álcool foi observada entre 23.6% (Davis et al., 2006) e 40.3% (Hasin et al., 2005) desses pacientes. Além disso, há evidências de que filhos de indivíduos dependentes de álcool apresentam risco elevado de desenvolverem Transtorno Depressivo Maior (Hill et al., 2008).

1.2 Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH)

O TDAH caracteriza-se por um conjunto de sintomas que ocorrem em níveis inapropriados para a idade (ou etapa de desenvolvimento), causando sofrimento e prejuízo significantes. Esses comportamentos são divididos em duas dimensões principais de sintomas: sintomas de desatenção e sintomas de hiperatividade/impulsividade. Segundo o DSM-IV-TR (APA, 2000), o TDAH é dividido em três subtipos principais – Combinado, Predominantemente Desatento e Predominantemente Hiperativo-Impulsivo – de acordo com o número e grupo de sintomas apresentados na Tabela II.

Tabela II. Critérios diagnósticos do DSM-IV-TR para Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (APA, 2000).

Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade

A. Ou (1) ou (2)

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

Desatenção:

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

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

Hiperatividade:

- (a) frequentemente agita as mãos ou os pés ou se remexe na cadeira
- (b) frequentemente abandona sua cadeira na sala de aula ou outras situações nas quais se espera que permaneça sentado
- (c) frequentemente corre ou escala em demasia, em situações impróprias (em adolescentes e adultos, pode estar limitado a sensações subjetivas de inquietação)
- (d) com frequência tem dificuldade para brincar ou se envolver silenciosamente em atividades de lazer
- (e) esta frequentemente "a mil" ou muitas vezes age como se estivesse "a todo vapor"
- (f) frequentemente fala em demasia

Impulsividade:

- (g) frequentemente dá respostas precipitadas antes de as perguntas terem sido completamente formuladas
- (h) com frequência tem dificuldade para aguardar sua vez
- (i) frequentemente interrompe ou se intromete em assuntos alheios (p. ex., em conversas ou brincadeiras)

- B. Alguns sintomas de hiperatividade-impulsividade ou de desatenção causadores de comprometimento estavam presentes antes dos 7 anos de idade.
- C. Algum comprometimento causado pelos sintomas esta presente em dois ou mais contextos (p. ex., na escola [ou trabalho] e em casa).
- D. Deve haver claras evidências de um comprometimento clinicamente importante no funcionamento social, acadêmico ou ocupacional.
- E. Os sintomas não ocorrem exclusivamente durante o curso de um Transtorno Global do Desenvolvimento, Esquizofrenia ou outro Transtorno Psicótico, nem são mais bem explicados por outro transtorno mental (p. ex Transtorno do Humor, Transtorno de Ansiedade, Transtorno Dissociativo ou Transtorno da Personalidade).

Codificar com base no tipo:

314.01 Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade, Tipo Combinado: se tanto o Critério A1 quanto o Critério A2 são satisfeitos durante os últimos 6 meses.

314.00 Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade, Tipo Predominantemente Desatento: se o Critério A1 é satisfeito, mas não o Critério A2, durante os últimos 6 meses.

314.01 Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade, Tipo Predominantemente Hiperativo-Impulsivo: se o Critério A2 é satisfeito, mas não o Critério A1, durante os últimos 6 meses.

Estima-se que cerca de 5,3% das crianças apresentem o TDAH, sendo a prevalência semelhante nos diversos continentes (Polanczyk et al., 2007). Embora não haja consenso sobre o percentual exato, acredita-se que cerca de metade das crianças manterão o diagnóstico quando adultos (Kessler et al., 2010), sendo a prevalência de TDAH adultos estimada em 2,5% (Simon et al., 2009). O diagnóstico do TDAH em adultos é feito seguindo os mesmos critérios indicados pelo DSM-IV-TR, no entanto, a descrição dos sintomas é normalmente adaptada para o contexto de vida de adultos. A permanência dos sintomas do TDAH nos adultos está relacionada a diversos prejuízos na vida profissional, acadêmica e nos relacionamentos sociais e está associada com riscos maiores para o desenvolvimento de outras patologias psiquiátricas (Wender et al., 2001; Barkley et al., 2006; Rosler et al., 2010).

A herdabilidade do TDAH é estimada em 76% em crianças, estando entre as mais altas dentre os transtornos psiquiátricos (Faraone et al., 2005). Já a herdabilidade da forma persistente de TDAH (permanência do TDAH em adultos) foi inicialmente estimada em 30% (Boomsma et al., 2010), valor bem abaixo da estimada para crianças. No entanto, para tal estudo, os questionários utilizados para avaliação dos sintomas de TDAH foram respondidos somente de acordo com a auto-avaliação de cada indivíduo, diferentemente do que ocorre com as crianças, onde medidas de sintomatologia são obtidas através da avaliação dos pais. Assim, a estimativa da herdabilidade do TDAH em adultos permanecia como uma questão em aberto uma vez que é sugerido que contar somente com medidas de auto-avaliação pode representar um critério pouco robusto no caso de pacientes com TDAH (Kooij et al., 2010; Franke et al., 2012).

No início deste ano, no entanto, um grande estudo longitudinal, contando tanto com dados de auto-avaliação como de informantes (pais), revelou que a herdabilidade dos sintomas relacionados ao TDAH mantém-se alta ao longo do desenvolvimento, sendo estimada em cerca de 80% desde a infância até o início da vida adulta (19 a 20 anos) (Chang et al., 2013). Os autores desse estudo revelam outro fato interessante: eles sugerem que a manutenção de alta herdabilidade no decorrer do desenvolvimento é resultado tanto de estabilidade como de inovação genética. Ou seja, o conjunto de fatores genéticos

responsáveis pela alta herdabilidade do TDAH na infância explica somente uma parcela (24%) da herdabilidade do TDAH na adolescência e na vida adulta, períodos em que o efeito de conjuntos de fatores genéticos distintos é manifestado (Chang et al., 2013).

Com base em resultados vindos de modelos animais, considerações teóricas e na eficácia do uso de estimulantes no tratamento do TDAH, genes implicados no sistema dopaminérgico são apontados como tendo papel importante na susceptibilidade ao TDAH, embora genes não relacionados a este sistema já tenham também sido implicados. Essas informações serão detalhadas na Seção 1.5 – *O Papel Central do Sistema Dopaminérgico* deste Capítulo.

A abordagem por GWAS vem sendo empregada na busca por polimorfismos genéticos comuns que contribuam para a etiologia do TDAH e também como uma ferramenta para validar associações previamente encontradas e/ou gerar novas hipóteses biológicas. Pelo menos sete GWAS (Lasky-Su et al., 2008; Lesch et al., 2008; Neale et al., 2008; Mick et al., 2010; Neale et al., 2010a; Hinney et al., 2011; Stergialouli et al., 2012) e uma meta-análise (Neale et al., 2010b) foram conduzidos para o TDAH até o momento, no entanto ainda não foi possível a identificação de variantes que estejam significativamente associadas ao transtorno após correção estatística para múltiplos testes. Embora esses estudos ainda não tenham sido capazes de identificar associações com SNPs específicos, os resultados vêm apontando para um papel importante de genes envolvidos em processos celulares básicos, tais como adesão celular, migração neuronal, reguladores de plasticidade sináptica e de canais iônicos (Poelmans et al., 2011; Franke et al., 2012).

O TDAH é um transtorno bastante heterogêneo no qual as frequentes comorbidades parecem exercer uma forte influência em sua manifestação clínica. Dentre crianças com TDAH, já foi sugerido que até 87% apresentem pelo menos uma comorbidade e 67% tenham pelo menos duas comorbidades (Kadesjo e Gillberg, 2001). Da mesma forma, dentre adultos com TDAH, estima-se que entre 68-89% apresentem uma ou mais comorbidades (Sobanski, 2006). A prevalência tanto de transtornos externalizantes quanto internalizantes é elevada em

indivíduos com TDAH. Estudos recente indicam que entre 40% e 50% das crianças e adolescentes com TDAH apresentem comorbidade com transtornos externalizantes (TC e/ou TDO) e entre 17% e 36% tenham algum transtorno internalizante (transtornos de ansiedade e depressivos) (Elia et al., 2009; Perera et al., 2012).

O TC e o TDO estão reconhecidamente entre as comorbidades mais prevalentes no TDAH (Elia et al., 2009). Em crianças e adolescentes com TDAH a taxa de comorbidade com TC pode ser estimada em torno de 17% (Hamshere et al., 2013). Já a prevalência de problemas relacionados a conduta em adultos com TDAH foi estimada em 57,8%, enquanto que em adultos sem TDAH essa estimativa é em torno de 7% (Ebejer et al., 2012). Dentre os adultos com TDAH, a presença de histórico de TC (atual ou passado) está associada com maior gravidade dos sintomas e grau de prejuízo do TDAH, bem como com taxas mais elevadas de comorbidade com transtornos psiquiátricos durante a vida adulta (Vitola et al., 2012; Ebejer et al., 2012).

Além disso, dentre os indivíduos com a TDAH, a presença concomitante do TC parece formar um subgrupo distinto, o qual possui uma maior influência de fatores genéticos bem como uma apresentação clínica mais grave (Thapar et al., 2001). Recentemente uma meta-análise com dados de GWAS de TDAH corroborou essa concepção ao indicar que o subgrupo de crianças com TDAH com comorbidade com TC apresentavam escores de risco genético mais elevados que aquelas que não tinham TC (Hamshere et al., 2013). Assim, há um forte conjunto de evidências, vindo de estudos com pares de gêmeos, sugerindo que o TDAH e o TC compartilhem, ao menos em parte, fatores genéticos de risco em comum e que isso, por sua vez, poderia contribuir para explicar as altas taxas de comorbidade observadas entre o TDAH e o TC (Thapar et al., 2001; Nadder et al., 2002; Dick et al., 2005).

Como descrito na seção anterior (Seção 1.1 – *Transtorno por uso de Álcool*), a ocorrência concomitante do TDAH e do TUS também tem sido relatada em vários estudos (Wilens, 2004; Upadhyaya, 2008; Oortmerssen et al., 2012). Já foi sugerido que mesmo os parentes de 1º grau de indivíduos com TDAH

apresentam risco elevado para o desenvolvimento do TUS, independentemente de eles próprios apresentarem ou não TDAH (Biederman et al., 2008). A relação entre a presença do TDAH durante a infância e o subsequente desenvolvimento do TUS na vida adulta vem sendo intensamente investigada e foi recentemente avaliada por dois estudos de meta-análise (Lee et al., 2011; Charach et al., 2011). Ambas indicaram que o TDAH na infância está associado a uma maior prevalência do TUS na vida adulta. Como será descrito a seguir, há evidências também de que essa relação entre TDAH e TUS possa ser mediada pela presença do TC.

1.3 Transtorno de Conduta (TC)

Como vem sendo descrito nas seções anteriores, o TC é um transtorno externalizante altamente comórbido com o TDAH e o TUS. O TC caracteriza-se por um padrão de comportamento repetitivo e persistente no qual são violados os direitos individuais dos outros, ou normas, ou regras sociais importantes próprias da idade (APA, 2000). Segundo o DSM-IV-TR (APA, 2000), o diagnóstico de TC é feito com base na presença de três (ou mais) dos critérios listados na Tabela III nos últimos 12 meses, com a presença de pelo menos um deles nos últimos 6 meses.

A estimativa da prevalência nos Estados Unidos do TC ao longo da vida é de 9,5% (12% no sexo masculino e 7,1% no sexo feminino) (Nock et al., 2006) e estudos com pares de gêmeos estimaram a herdabilidade do TC entre 40-80% (Hicks et al., 2004; Maes et al., 2007).

Comparado a outros transtornos psiquiátricos na infância, a presença de TC está dentre os mais fortes preditores de TUS na vida adulta (Kim-Cohen et al., 2003). Inclusive, um estudo recente avaliando 1.774 gêmeos indicou que a maior parte da associação genética entre o TDAH na adolescência e a Dependência de Álcool na vida adulta é compartilhada com o TC, o que poderia estar refletindo um risco generalizado a esses transtornos externalizantes (Edwards e Kendler, 2012).

Tabela III. Critérios Diagnósticos DSM-IV Transtorno de Conduta

Transtorno da Conduta

- A. Um padrão repetitivo e persistente de comportamento no qual são violados os direitos individuais dos outros, ou normas, ou regras sociais importantes próprias da idade, manifestado pela presença de três (ou mais) dos seguintes critérios nos últimos 12 meses, com presença de pelo menos um deles nos últimos 6 meses:

Agressão a pessoas e animais

- (1) provocações, ameaças e intimidações frequentes
- (2) lutas corporais frequentes
- (3) utilização de arma capaz de infligir graves lesões corporais (p. ex., bastão, tijolo, garrafa quebrada, faca, revolver)
- (4) crueldade física para com pessoas
- (5) crueldade física para com animais
- (6) roubo em confronto com a vítima (p. ex., bater carteira, arrancar bolsa, extorsão, assalto a mão armada)
- (7) coação para que alguém tivesse atividade sexual consigo

Destruição de patrimônio

- (8) envolveu-se deliberadamente na provocação de incêndio com a intenção de causar sérios danos
- (9) destruiu deliberadamente o patrimônio alheio (diferente de provocação de incêndio)

Defraudação ou furto

- (10) arrombou residência, prédio ou automóvel alheios
- (11) mentiras frequentes para obter bens ou favores ou para esquivar-se de obrigações legais (i. é, ludibria pessoas)
- (12) roubo de objetos de valor sem confronto com a vítima (p. ex., furto em lojas, mas sem arrombar e invadir; falsificação)

Sérias violações de regras

- (13) frequente permanência na rua à noite, contrariando proibições por parte dos pais, iniciando antes dos 13 anos de idade
- (14) fugiu de casa à noite pelo menos duas vezes, enquanto vivia na casa dos pais ou em lar adotivo (ou uma vez, sem retornar por um extenso período)
- (15) gazetas frequentes, iniciando antes dos 13 anos de idade

- B. A perturbação do comportamento causa comprometimento clinicamente significativo do funcionamento social, acadêmico ou ocupacional.
- C. Se o indivíduo tem 18 anos ou mais, não são satisfeitos os critérios para Transtorno da Personalidade Anti-Social.

Codificar com base na idade de início:

312.81 Tipo com início na Infância: início de pelo menos um critério característico do Transtorno da Conduta antes dos 10 anos de idade.

312.82 Tipo com início na Adolescência: ausência de quaisquer critérios característicos do Transtorno da Conduta antes dos 10 anos de idade.

312.89 Transtorno da Conduta, início Inespecificado: a idade do início não é conhecida.

Ainda salientando o papel do TC sobre o risco de TUS, tem sido sugerido que o TC na infância (comórbido ou não com TDAH), e não o TDAH especificamente, seja preditor do Transtornos por Uso de Álcool na vida adulta. Além disso, alguns estudos têm indicado que a relação entre o TDAH e TUS deixa de ser significativa quando a análise é controlada para a presença de TC

(Disney et al., 1999; Pardini et al., 2007; Fergusson et al., 2007; Elkins et al., 2007; Palmer et al., 2013).

Dessa forma, um conjunto forte de evidências indica que o TC possa exercer um efeito mediador na relação entre o TDAH na infância e o subsequente desenvolvimento de Transtorno por Uso de Álcool e/ou outros TUS na vida adulta (Brook et al., 2008; Brook et al., 2010; Fergusson et al., 2007; Tuithof et al., 2012; Palmer et al., 2013). Entretanto, devido a diversos achados associando o TDAH ao TUS, confirmados por meta-análises (Lee et al., 2011; Charach et al., 2011), um papel independente do TDAH nessa predição não pode ser prontamente excluído.

1.4 Dimensões de Personalidade

Existem diversos instrumentos para avaliar medidas de personalidade, mas um dos mais usados atualmente em estudos de genética psiquiátrica é o Inventário de Temperamento e Caráter proposto por Cloninger et al. (1993). Por esse questionário são avaliadas quatro dimensões de temperamento (Procura por Novidades, Evitação de Dano, Dependência de Recompense e Persistência) e três de caráter (Auto-Direcionamento, Cooperatividade e Auto-Transcedência). As medidas de caráter, ao contrário das de temperamento, parecem ser dimensões com baixa herdabilidade, ter uma manifestação mais tardia no curso do desenvolvimento e ser influenciadas pelo nível de estudo e pelo ambiente familiar (Cloninger et al., 1993).

Os resultados mais consistentes da relação entre essas dimensões de personalidade e o TDAH indicam que indivíduos adultos com TDAH apresentam escores mais elevados tanto de Procura por Novidades quanto de Evitação de Dano do que indivíduos sem TDAH (Downey et al., 1997; Anckarsater et al., 2006; Jacob et al., 2007; Faraone et al., 2009). Há também indícios de que o TDAH

esteja associado com escores mais baixos de Persistência e, em menor grau, de Dependência de Recompensa (Rettew et al., 2004; Faraone et al., 2009).

Alguns autores, no entanto, sugerem que essa relação entre as dimensões de temperamentos possa variar de acordo com a gravidade dos sintomas de desatenção e/ou hiperatividade-impulsividade e com subtipo de TDAH (Salgado et al., 2009; Muller et al., 2010; Gomez et al., 2012; Merwood et al., 2013a). Um estudo de gêmeos recente indica que, enquanto escores de Procura por Novidade estão associados tanto com sintomas de desatenção quanto de hiperatividade-impulsividade, os escores de Evitação de Dano estão correlacionados somente com o sintomas de desatenção e que escores de Persistência estão negativamente correlacionados com sintomas de desatenção e positivamente correlacionados com sintomas de hiperatividade-impulsividade (Merwood et al., 2013a). Além disso, este estudo indica que os sintomas de TDAH compartilham uma base etiológica em comum com essas dimensões de temperamento, tendo sido encontradas correlações genéticas positivas entre os sintomas de desatenção e Procura por Novidades e Evitação de Dano e entre os sintomas de hiperatividade-impulsividade e Procura por Novidades; é sugerido também que escores de Persistência tenham correlação genética positiva com sintomas de hiperatividade-impulsividade e negativa com sintomas de desatenção.

Esses resultados estão de acordo com achados prévios do nosso grupo de pesquisa que indicaram que a gravidade de sintomas de desatenção estava associada com escores elevados de Evitação de Dano enquanto que sintomas de hiperatividade-impulsividade estavam associados com aumento nos escores de Procura por Novidades e Persistência (Salgado et al., 2009). Nessa mesma linha, um estudo subsequente indicou que indivíduos com TDAH do subtipo Desatento apresentavam escores significativamente mais altos de Evitação de Dano e mais baixos de Procura por Novidade do que os indivíduos dos subtipos Hiperativo-Impulso e Combinado (Muller et al., 2010). Gomez et al. (2012) corroboram também a relação entre os sintomas de desatenção e escores elevados de Evitação de Dano e entre os sintomas de hiperatividade-impulsividade e escores elevados de Persistência.

Indivíduos com escores elevados de Procura por Novidades são normalmente descritos como impulsivos, curiosos, instáveis, temperamentais, irritáveis, extravagantes e indisciplinados, são dispostos a se engajar em novas atividades e interesses, mas têm tendência a negligenciar detalhes importantes e ficam distraídos ou entediados facilmente (Cloninger et al., 1987). Essas características assemelham-se bastante com os sintomas de TDAH, especialmente os sintomas de hiperatividade-impulsividade.

Já indivíduos com escores altos de Evitação de Dano são caracterizados como sendo mais cautelosos, tensos, apreensivos, medrosos, inibidos, envergonhados, pessimistas e se cansam facilmente (Cloninger et al., 1987). A presença de escores elevados de Evitação de Dano, caracterizada por um viés para comportamentos inibitórios ou de internalização, em indivíduos com TDAH está de acordo com a frequente comorbidade do TDAH com transtornos de ansiedade e depressivos (Biederman et al., 2006; Kessler et al., 2006). Especialmente dentre os indivíduos com mais sintomas de desatenção, para os quais já foram atribuídos níveis mais elevados de Evitação de Dano, a prevalência de transtornos internalizantes costuma estar elevada (Acosta et al., 2008). Adicionalmente, uma meta-análise recente encontrou escores significativamente elevados de Evitação de Dano em pacientes da maioria dos transtornos psiquiátricos investigados, incluindo os Transtornos Depressivo Maior, Bipolar, Obsessivo-Compulsivo, de Pânico, Fobia Social, Anorexia Nervosa, Bulimia Nervosa e Esquizofrenia (Miettunen e Raevuori, 2012).

A dimensão de Persistência, originalmente pertencente à dimensão de Dependência de Recompensa e posteriormente incluída no modelo psicobiológico de Cloninger et al., (1993) como uma dimensão independente, reflete a capacidade de perseverança apesar da frustração e fadiga. É sugerido que escores de baixa Persistência em adultos com TDAH indicam que eles tendem a desistir facilmente quando frustrados e que eles são menos propensos a se empenhar por seus objetivos e a perseverar em tarefas (Faraone et al., 2009). Essa baixa persistência é consistente com os déficits de funcionamento executivo visto em muitos pacientes com TDAH (Biederman et al., 2007).

1.5 O Papel Central do Sistema Dopaminérgico

Como mencionado na Seção anterior, embora não seja o único sistema implicado, o sistema dopaminérgico é considerado como tendo papel central no desenvolvimento de transtornos psiquiátricos comuns, incluindo o TUS e o TDAH - principais focos de estudo desse doutorado (revisões em Tripp e Wickens 2009; Volkow et al., 2009; Dichter et al., 2012; Gorwood et al., 2012).

Alguns autores sugerem que o mecanismo crucial para a dependência de diferentes tipos de substâncias está relacionado com a ativação da transmissão dopaminérgica induzida por essas substâncias através da via mesolímbica (Wise e Bozarth, 1987; revisão em Dichter et al., 2012), enquanto outros defendem que o desenvolvimento do TUS, na verdade, reflete um estado de hipo-função dopaminérgica (Melis et al., 2005). Independente do mecanismo primário de susceptibilidade, diversas linhas de evidências apoiam a noção de que indivíduos com TUS são caracterizados por uma diminuição do interesse/resposta a estímulos normais – não provocados pelo uso de substâncias (álcool, drogas) – fenômeno conhecido como “síndrome de deficiência de recompensa” (Blum et al., 1996; revisões em Diana, 2011; Diechter et al., 2012). Assim, dentre os vários possíveis genes ou sistemas candidatos a estudo da vulnerabilidade ao TUS, os genes relacionados ao sistema dopaminérgico têm recebido especial interesse (revisões em Bowirrat e Oscar-Berman 2005; Le Foll et al., 2009).

Da mesma forma, em 1991, Levy propôs a teoria dopaminérgica do TDAH, na qual era sugerido que déficits dopaminérgicos em regiões cerebrais específicas poderiam resultar em sintomas característicos do TDAH. Desde então, muitos estudos têm sido conduzidos na tentativa de compreender os mecanismos e fatores pelos quais o sistema dopaminérgico poderia predispor ao TDAH. A investigação do papel deste sistema na etiologia do TDAH torna-se especialmente interessante uma vez que o uso de psico-estimulantes, os quais elevam os níveis de dopamina extracelular, causam rápido alívio dos sintomas em até 70% dos indivíduos com TDAH (Spencer et al., 1996). O metilfenidato (mais conhecido no Brasil pelos nomes comerciais *Ritalina* e *Concerta*) é o

medicamento de escolha para o tratamento do TDAH há mais de 50 anos e age inibindo a função de recaptção do transportador de dopamina e, conseqüentemente, aumentando os níveis de dopamina na fenda sináptica que estarão disponíveis para serem ligados aos receptores de dopamina (Volkow et al., 2005). Assim, o metilfenidato funciona aumentando a neurotransmissão dopaminérgica e essa é uma das evidências mais robustas do envolvimento deste sistema com o TDAH. Embora não haja ainda um consenso sobre fatores específicos, evidências de estudos genéticos, neurobiológicos e com modelos animais também vêm indicando que a neurotransmissão dopaminérgica desempenha um papel importante da na etiologia do TDAH (revisões em Tripp e Wickens, 2009; Genro et al., 2012; Wu et al., 2012; Shen et al., 2012).

2. ESTUDOS MOLECULARES

Embora já tenha sido demonstrado que grande parte dos transtornos psiquiátricos comuns apresentam uma herdabilidade moderada a alta e que alguns conjuntos de genes candidatos tenham sido propostos, um maior entendimento a respeito dos fatores diretamente envolvidos na susceptibilidade genética a esses transtornos ainda se faz necessária. Acredita-se que a etiologia desses fenótipos complexos compreenda o efeito de muitas variantes comuns presentes em diversos genes, cada uma contribuindo com um tamanho de efeito muito pequeno (fenômeno conhecido como “doenças comuns – variantes comuns”), embora o papel de variantes raras com tamanho de efeito maior não seja de forma alguma descartada (revisão em McClellan e King, 2010).

Os tradicionais estudos avaliando genes candidatos pela abordagem caso-controle resultam em associações que muitas vezes não são replicadas. Já os estudos de GWAS, onde tantas esperanças foram depositadas por grande parte da comunidade científica, vêm apresentando resultados aquém dos desejados. Os estudos de genes candidatos do tipo caso-controle normalmente testam a associação individual de um ou poucos polimorfismos em genes plausivelmente envolvidos com o fenótipo de interesse. Os GWAS não contam com uma hipótese prévia de quais genes estão envolvidos e testam individualmente um grande número de SNPs (de milhares a milhões) espalhados ao longo do genoma. Em decorrência disso, amostras extremamente grandes são necessárias para a identificação de variantes que ultrapassem o critérios de significância estabelecidos para GWAS devido a correção para múltiplos testes.

Alguns fatores importantes, na maioria das vezes negligenciados por ambas as abordagens, podem estar contribuindo para a complexidade dos estudos genéticos de transtornos psiquiátricos. Um deles seria, além do pequeno tamanho de efeito atribuído a diversas variantes genéticas comuns, a presença de ampla heterogeneidade genética, onde variantes diferentes acarretam fenótipos similares. Uma possível maneira de lidar com essa característica é estimando o efeito de vários polimorfismos em conjunto. Isso pode ser feito pela análise de

agrupamentos gênicos, os quais podem vir a representar unidades funcionais, com efeitos relacionados, portando múltiplos polimorfismos de risco e onde haplótipos ultrapassam as delimitações de cada gene, englobando SNPs de genes vizinhos (Gelernter et al., 2006; Yang et al., 2007, 2008). Outra maneira de analisar o efeito conjunto de vários polimorfismos é através da análise de escores de risco poligênicos utilizando dados gerados em GWAS, onde é possível estimar a parcela de risco que pode ser atribuída ao conjunto geral de variantes genéticas comuns (revisão em Dudbridge et al., 2013).

Um segundo fator complicador nesses estudos seria a própria heterogeneidade clínica característica dos transtornos psiquiátricos comuns. No caso do TDAH, por exemplo, a presença de determinadas comorbidades pode indicar perfis clínicos e de susceptibilidade genética distintos (Thapar et al., 2001; Hamshere et al., 2013). Assim, é interessante também investigar o papel de fatores genéticos na modulação clínica desses transtornos, uma vez que esses fatores podem estar associados à presença de comorbidades e características de personalidades específicas dentre indivíduos com um mesmo transtorno.

O terceiro fator que vale a pena chamar a atenção é a possibilidade de que efeitos epistáticos (descritos em mais detalhes na Seção 2.2 *Efeitos Epistáticos e o Papel da Heteromerização* deste Capítulo) tenham um papel importante na susceptibilidade a esses transtornos, uma vez que é esperado que a maioria das proteínas codificadas interaja fisicamente ou funcionalmente com outras proteínas ao longo de rotas biológicas e dependam dessas interações para o seu funcionamento (Zuk et al., 2012; Hemani et al., 2013).

Foram justamente estes três fatores limitantes nos estudos genéticos de transtornos psiquiátricos comuns (ou mesmo de fenótipos de herança complexa em geral) que motivaram e guiaram os estudos conduzidos durante este doutorado. As seções a seguir refletem 1) o ponto de partida que instigou a concepção de novas abordagens para tentar responder antigas questões, 2) a inclusão imediata e aproveitamento de dados provindos de outras áreas de pesquisa na geração de hipóteses baseadas em evidências e 3) a caracterização dos genes/agrupamento gênico que investigamos durante esse período, incluindo

os motivos que os tornam fortes candidatos a este estudo, bem como a identificação da necessidade de abordar outros aspectos (não clínicos) de um agrupamento gênico específico.

2.1 O Tradicional Receptor de Dopamina D2 (*DRD2*)

Genes que codificam os receptores de dopamina vêm sendo alvo de intensos estudos na tentativa de melhor esclarecer o papel relativo de cada subtipo distinto de receptor, tanto na modulação da variabilidade comportamental comum quanto patológica. Existem cinco tipos de receptores de dopamina (*DRD1-DRD5*), os quais são subdivididos em receptores do tipo *D1-like* (*DRD1* e *DRD5*) e receptores do tipo *D2-like* (*DRD2*, *DRD3* e *DRD4*) de acordo com sua capacidade de ativar ou inibir, respectivamente, a enzima Adenil Ciclase, responsável pela conversão de ATP em AMP cíclico (Figura 1). Os receptores de dopamina estão envolvidos com uma gama de proteínas sinalizadoras de resposta e, dessa forma, são capazes de regular diversas atividades relacionadas com locomoção, reforço positivo ou recompensa, cognição e controle metabólico no sistema nervoso central (revisão em Lee e Wong, 2010). A distribuição de cada um dos tipos de receptores de dopamina no cérebro apresenta padrões distintos, no entanto há várias áreas de sobreposição (revisão em Wu et al., 2012).

O gene *DRD2* (sigla proveniente do nome em inglês: *Dopamine Receptor D2*), localizado na região cromossômica 11q23, codifica o receptor de dopamina D2. Com cerca de 65.000 nucleotídeos, o gene *DRD2* consiste em oito éxons, sendo que a sua região codificadora abrange do 2º ao 8º éxon (Figura 1). Através do mecanismo de *splicing* alternativo, este gene codifica duas isoformas que diferem na presença de 29 aminoácidos correspondentes ao 6º éxon: a forma curta D2S (com 414 aminoácidos) apresenta localização preferencialmente pré-sináptica, enquanto a forma longa D2L (com 443 aminoácidos) age preferencialmente em sítios pós-sinápticos (Usiello et al., 2000). Essa distribuição

neuronal distinta entre as duas isoformas do receptor de dopamina D2 na sinapse indica que elas exercem diferentes funções na transmissão dopaminérgica (Usiello et al., 2000). Assim, além de ser um dos receptores de dopamina pós-sinápticos mais abundantes, o receptor de dopamina D2 age como auto-receptor pré-sináptico em terminais de neurônios dopaminérgicos.

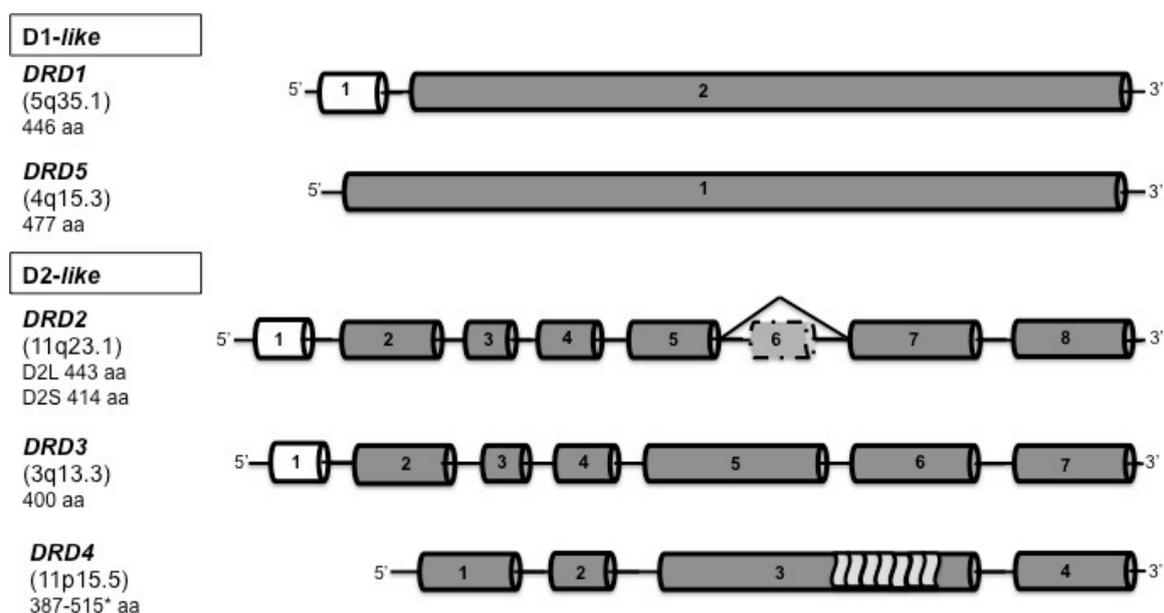


Figura 1. Representação esquemática da estrutura gênica dos receptores de dopamina D1-like (*DRD1* e *DRD5*) e D2-like (*DRD2*, *DRD3* e *DRD4*). Blocos numerados representam éxons: em cinza éxons traduzidos; em branco éxons não traduzidos. Linhas entre éxons representam íntrons. Região do *DRD2* envolvida no processo de *splicing* alternativo é indicada pela localização do 6º éxon (bloco pontilhado), o qual está presente na isoforma longa desse receptor (D2L) mas não na isoforma curta (D2S). *O número de aminoácidos (aa) codificados pelo *DRD4* depende do número de repetições no polimorfismo VNTR de 48pb, o qual está indicado no 3º éxon (neste caso, é ilustrada a variante de 7 repetições – D4.7R). Mais detalhes da estrutura desses receptores podem ser encontrados em Missale et al., 1998, Lee e Wong 2010 e Wu et al., 2012.

Estudos de neuroimagem têm consistentemente indicado que indivíduos com TUS (incluindo dependentes de álcool, nicotina, cocaína, heroína, entre outros) apresentam diminuição significativa da disponibilidade de receptores de dopamina D2 na região estriatal do cérebro, a qual persiste mesmo após meses de desintoxicação (Volkow et al. 1993; Nader et al., 2006; Dalley et al., 2007,

revisão em Volkow et al., 2009). Este achado sugere que essa possa ser uma característica neurobiológica de predisposição à dependência de substâncias e assim, diferenças individuais de expressão de *DRD2* provocadas por polimorfismos neste gene poderiam estar associadas a processos comportamentais específicos que conferem vulnerabilidade ao abuso de drogas.

Experimentos com modelos animais sugerem que a presença de receptores de dopamina D2 é crucial para a manifestação das propriedades de reforço/recompensa de substâncias de abuso uma vez que esses efeitos, os quais estão relacionados com a capacidade dessas substâncias de gerar dependência psíquica, estão ausentes em camundongos deficientes do gene *DRD2* (*DRD2-knockout*) (Maldonado et al., 1997).

Um dos polimorfismos mais estudados na genética psiquiátrica, principalmente em relação ao TUS, é o SNP Taq1A (T/C; rs1800497). Acreditava-se até 2004 que este SNP situava-se em uma região não traduzida a 3' do gene *DRD2* uma vez que estava a cerca de 10 kb de sua região codificadora e não havia um gene descrito para esta região. No entanto, Neville et al. (2004) identificaram e caracterizaram um novo gene situado a 3' do gene *DRD2*, denominando-o *ANKK1* (do inglês *Ankyrin Repeat and Kinase Domains containing 1*). Revelou-se, então, que o polimorfismo Taq1A na verdade corresponde a um polimorfismo não-sinônimo situado no oitavo éxon do gene *ANKK1*. Dessa forma, a transição do alelo "C" (A2) para o alelo "T" (A1) no SNP Taq1A provoca uma troca de aminoácidos (Glu713Lys) no domínio C-terminal de da proteína codificada, para o qual há indícios de papel mediador em interações proteína-proteína (Michaely et al., 2002; Neville et al., 2004). Mais detalhes sobre o gene *ANKK1* serão apresentados na Seção 2.3.1 – *Características Individuais dos Genes do NTAD*.

Ainda em 1990, Blum et al. identificaram pela primeira vez a associação do SNP Taq1A (identificado então como polimorfismo do gene *DRD2*) com dependência de álcool. Essa foi a primeira evidência da associação entre genes de receptores de neurotransmissores e susceptibilidade à dependência de substâncias. Após esse achado inicial, centenas de outros estudos investigaram

não só o papel deste polimorfismo em relação à dependência de álcool e outros transtornos mas também o seu possível efeito neurofisiológico para explicar tais associações.

Há um forte conjunto de evidências indicando que portadores do alelo A1 (T) do Taq1A apresentam uma função dopaminérgica reduzida. Diversos estudos indicam que a presença desse alelo confere redução significativa (entre de 10% a 40%) do número de receptores D2 em diferentes áreas cerebrais relacionadas ao estriado (Noble et al., 1991; Thompson et al., 1997; Pohjalainen et al., 1998; Jonsson et al., 1999). Além disso, foi indicado que o alelo A1 do Taq1A está associado a um aumento da atividade estriatal da descarboxilase de aminoácido L-aromático, a enzima final da biossíntese da dopamina (Laakso et al., 2005). Os autores sugerem que esse achado possa ser explicado por uma redução da expressão de *DRD2*, levando a uma diminuição da sua função como auto-receptores nos portadores desse alelo e um aumento na taxa de síntese de dopamina (Laakso et al., 2005).

Por outro lado, os resultados do papel do Taq1A na susceptibilidade à Dependência de Álcool e a outros transtornos psiquiátricos e características comportamentais têm se mostrados bastante inconsistentes. O papel do SNP Taq1A no TDAH foi inicialmente relatado em um amostra de crianças com Síndrome de Tourette (Comings et al., 1991; Comings et al., 1996), indicando uma associação entre a presença do alelo A1 do Taq1A e maior prevalência TDAH. Na sequência, estudos utilizando amostras específicas para TDAH foram delineados, os quais foram posteriormente analisados em meta-análise. Gizer et al. (2009) incluíram seis desses estudos para avaliar o papel do SNP Taq1A (utilizado como sendo marcador/representante do gene *DRD2*) no TDAH em crianças. Os resultados dessa meta-análise foram conflitantes, sendo que sob o modelo de análise de efeitos fixos eles encontram associação do alelo A1 do Taq1A com TDAH (OR=1.54 CI95%= 1.29-1.83 P<0.001) enquanto que sob o modelo de efeitos aleatórios eles relatam que somente uma baixa tendência para associação foi encontrada (OR=1.65, CI95%=0.89-3.06, P=0.110) (Gizer et al., 2009). É sugerido que esse resultado contraditório possa ser reflexo da forte e significativa heterogeneidade nos tamanhos de efeito encontrados em cada

estudo individual e, assim, mais estudos são necessários para esclarecer o papel do SNP Taq1A, ou mesmo de outros SNPs funcionais do gene *DRD2* (ou do *ANKK1*), na susceptibilidade ao TDAH. Mais recentemente, outra meta-análise incluindo nove estudos indicou associação do Taq1A com TDAH (OR=1.65, CI95%=1.05-2.58, P<0.0001) (Wu et al., 2012). No entanto, devido ao excesso de heterogeneidade encontrado em ambas meta-análises, os resultados a respeito do efeito do Taq1A na susceptibilidade ao TDAH permanecem inconclusivos (Gizer et al., 2009; Wu et al., 2012).

Da mesma forma, três meta-análises foram conduzidas para avaliar o papel do SNP Taq1A no tabagismo e obtiveram também resultados conflitantes, marcados por alta heterogeneidade (Li et al., 2004; Munafò et al., 2004, 2009). Li et al. (2004) conduziram uma meta-análise de 12 estudos e indicaram uma prevalência do alelo A1 do Taq1A significativamente maior em fumantes do que em não fumantes (OR=1.50, CI95%=1.33-1.70, P<0.0001). Por outro lado, Munafò et al. (2009), incluindo 29 estudos em sua meta-análise, não encontraram associação significativa do Taq1A com características do tabagismo (idade de início, persistência, intensidade). Entretanto, eles encontram associação entre o número de participantes do sexo masculino nos estudos e o tamanho de efeito dos estudos individuais, indicando que a associação do Taq1A com a idade de início e a persistência do tabagismo seja mais forte em homens (Munafò et al., 2009).

Associações desse SNP também já foram relatadas com outros fenótipos, na maioria dos casos indicando o alelo A1 como sendo de risco, como por exemplo, Dependência de Cocaína (Noble et al., 1993), Dependência de Heroína (Perez de los Cobos et al., 2007), resposta ao tratamento para dependência e intensidade de uso de heroína (Lawford et al., 2000), TPAS em dependentes de álcool (Ponce et al., 2003), abuso de substâncias em filhos de dependentes de álcool (Conner et al., 2005), atenção e controle inibitório (Rodriguez-Jimenez et al., 2006b), sintomas de ansiedade/depressão (Lawford et al., 2006; Hayden et al., 2010), Doença de Parkinson (Oliveri et al., 2000; Grevle et al., 2000), Esquizofrenia (nesse caso o alelo A2 (C) sendo o de risco; Parsons et al., 2007;

Dubertret et al., 2010). No entanto, outros estudos não encontram tais associações, como por exemplo, para Esquizofrenia (Ambrosio et al., 2004), resposta ao tratamento da dependência de heroína (Barrat et al., 2006), Doença de Parkinson (Comings et al., 1991; Kiyohara et al., 2011) e depressão (Comings et al., 1991).

Em estudos avaliando o efeito do Taq1A em dimensões de personalidade, a presença do alelo A1 já foi associada com escores elevados de Procura por Novidades (Noble et al., 1998; Berman et al., 2002) e reduzidos de Persistência (Nyman et al., 2009); embora um efeito oposto tenha sido descrito em relação à Procura por Novidades e à Dependência de Recompensa (Kazantseva et al., 2011). Ainda, em um estudo de ligação, Hill et al. (1999) mostraram que o SNP Taq1A estava ligado à dimensão de Evitação de Dano em uma amostra familiar de dependentes de álcool.

Atualmente, o achado mais consistente do Taq1A continua a ser em relação ao seu papel na susceptibilidade à Dependência de Álcool, havendo quatro meta-análises que corroboram esta associação (Munafò et al., 2007, Smith et al., 2008, Le Foll et al., 2009 e Wang et al., 2013). Munafò et al. (2007) incluíram em sua meta-análise dados de 40 estudos publicados entre 1990 e 2006 (total de 4.962 casos e 5.253 controles) e demonstraram que o alelo A1 do SNP Taq1A confere um risco moderado à Dependência de Álcool tanto em populações europeias (OR=1,19) quanto em asiáticas (OR=1,17). Resultado semelhante foi encontrado por Smith et al. (2008) e Le Foll et al. (2009), indicando que indivíduos com a presença do alelo A1 tinham um risco à Dependência de Álcool significativamente aumentado em relação àqueles indivíduos sem este alelo. A mais recente meta-análise incluiu dados de 61 estudos publicados entre 1990 e agosto de 2012 (total de 9.590 casos e 9.140 controles) e também corrobora a associação entre o alelo A1 do SNP Taq1A e à Dependência de Álcool (Wang et al., 2013).

Uma característica recorrente destas meta-análises é a evidência de heterogeneidade significativa entre os estudos incluídos. Diferenças quanto ao sexo, idade, histórico familiar, gravidade da dependência, presença de

comorbidades e características de personalidade entre as amostras dos diferentes estudos são alguns dos fatores que podem estar contribuindo para tais achados.

No entanto, uma vez que o Taq1A não afeta a expressão do gene *DRD2*, alvo de interesse tradicional de tais estudos, Wang et al. (2013) sugerem três hipóteses alternativas para explicar a associação deste SNP com a Dependência de Álcool: 1) este SNP pode estar localizado em um mesmo bloco de forte desequilíbrio de ligação de variantes causais; 2) pode estar codificando um elemento regulatório que afeta a expressão do gene *DRD2* diretamente; 3) pode influenciar a expressão do gene *ANKK1* o qual, subseqüentemente, poderia afetar a expressão do gene *DRD2*. Outro fator importante apontado por Wang et al. (2013) que pode levar a tal heterogeneidade seria o efeito de possíveis interações epistáticas envolvendo o gene *DRD2* (ou mesmo o *ANKK1*).

2.2 Efeitos Epistáticos e o Papel da Heteromerização

2.2.1 Efeitos Epistáticos

O termo “epistasia” foi cunhado por William Bateson há mais de 100 anos e desde então o seu conceito inicial foi expandido sendo hoje utilizado para definir praticamente qualquer conjunto de interações complexas entre *loci* genéticos (revisão em Phillips, 2008). Em 1918, R.A. Fisher definiu o termo relacionado “*epistacy*” como qualquer desvio estatístico da combinação aditiva de dois *loci* nos seus efeitos em um fenótipo, o que hoje é usualmente chamado de epistasia estatística ou interações estatísticas. Assim, epistasias biológicas (também chamadas interações genéticas ou interações gene-gene), de maneira geral, podem ser descritas como o fenômeno que ocorre quando alterações em um gene modifica o efeito de outro (e vice-versa), e podem ser detectadas comparando os efeitos no fenótipo de interesse (susceptibilidade a transtornos,

por exemplo) de alterações em um único gene (presença do alelo de risco de um dos genes, por exemplo) com os efeitos de alterações nos dois genes simultaneamente. Para isso, no modelo estatístico usado para testar a associação nos genes/marcadores moleculares investigados com o fenótipo de interesse, inclui-se um termo de interação e a melhora na qualidade de ajuste do modelo é avaliada (Ahlbom e Alfredsson, 2005).

Como mencionado anteriormente (Seção 2 – *Estudos Moleculares*), a abordagem utilizada por grande parte dos estudos gene-candidatos baseia-se na análise da associação de um ou mais polimorfismos em um gene específico com a presença de um diagnóstico específico em um grupo de indivíduos comparado com um outro grupo de indivíduos que não recebeu tal diagnóstico. Na era de GWAS, as análises em larga escala passaram a testar conjuntos muito grandes de polimorfismos, mas estas premissas de análise continuaram as mesmas.

No entanto, as funcionalidades de múltiplas proteínas parecem estar inter-relacionadas, seja por meio de interação física, por efeitos compensatórios ou por estarem na mesma rota funcional. Efeitos epistáticos podem gerar combinações de alto risco (com grande tamanho de efeito) a partir da interação de alelos de baixo risco (Moore et al., 2009). Além disso, mesmo não sendo observados efeitos principais significativos de SNPs individuais, muitos polimorfismos genéticos podem agir sinergicamente, levando ao fenótipo afetado (presença do transtorno, por exemplo) quando combinados (Okser et al., 2013). Desta forma, os efeitos epistáticos podem ter um papel fundamental na compreensão e esclarecimento dos tantos achados incongruentes entre estudos relatados na literatura, assim como para a falha na detecção de associações de SNPs individuais em estudos por GWAS (Ritchie, 2011; Zuk et al., 2012; Hemani et al., 2013).

Em estudos de GWAS, os SNPs individuais que atingiram nível de significância raramente explicam mais do que uma fração modesta da herdabilidade dos transtornos psiquiátricos, deixando no ar a questão do que poderia explicar o restante da herdabilidade, ou seja, a “herdabilidade perdida” (Manolio et al., 2009). Muitas hipóteses para explicar onde estão escondidos

esses efeitos genéticos vem sendo sugeridas, incluindo a presença de muitos outros polimorfismos de efeitos menores que ainda não foram descobertos, a presença de variantes raras (possivelmente conferindo tamanhos de efeito maiores), variante estruturais, interações gene-gene (efeitos epistáticos) e até estimativas inadequadas da herdabilidade (Manolio et al., 2009).

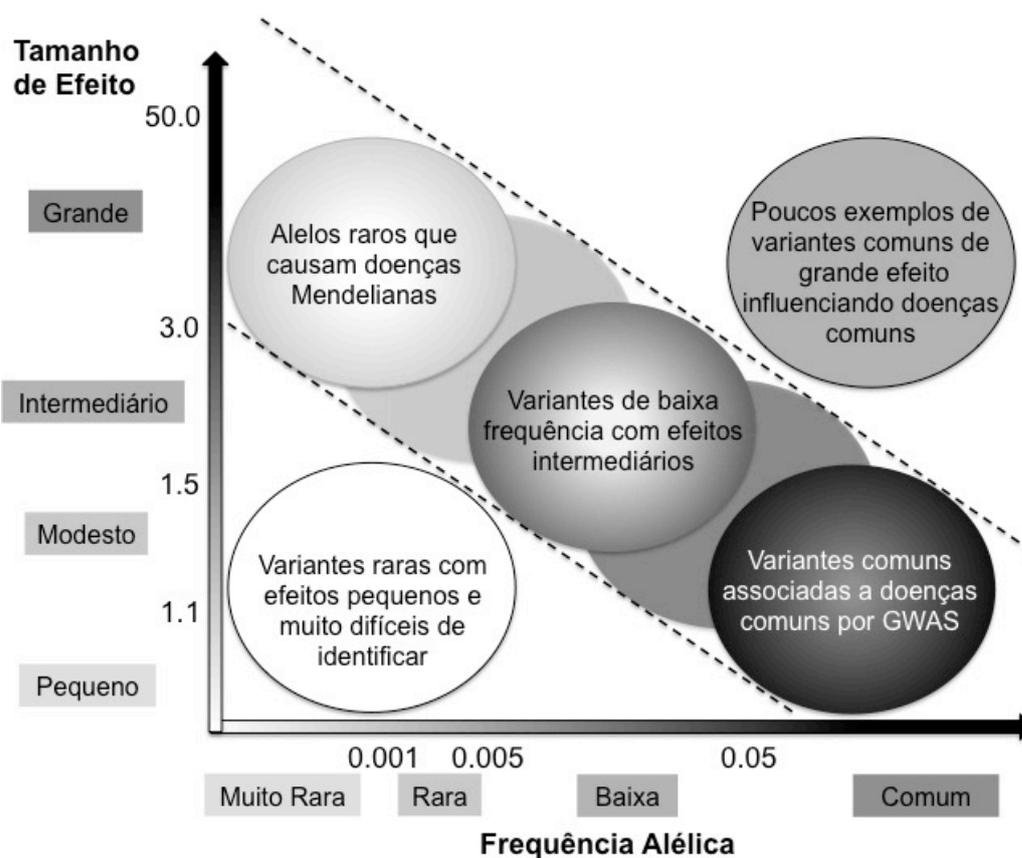


Figura 2. Probabilidade de identificar variantes genéticas pela frequência do alelo de risco e do tamanho de efeito (*odds ratio*). Adaptada de Manolio et al. (2009) os quais sugerem que maior ênfase e interesse são dados em identificar associações com características apresentadas dentro as linhas diagonais pontilhadas.

Atualmente, o debate entre quais caminhos levarão mais rapidamente e eficientemente à descoberta de onde ficou perdida a herdabilidade gira em torno de duas propostas principais: Por um lado, um grupo de pesquisadores sugere que as investigações devem ser principalmente direcionadas a encontrar variantes de baixa frequência, com tamanhos de efeitos modestos a intermediários, e também variantes raras com tamanhos de efeito intermediários a

altos (Figura 2; Manolio et al., 2009; Yang et al., 2010). Eles sugerem que essas variantes, combinadas às variantes comuns de tamanho de efeito pequeno a moderado já detectadas por GWAS, seriam capazes de explicar a herdabilidade fenotípica não fosse o tamanho amostral atual ainda insuficiente e os padrões de desequilíbrio de ligação incompletos entre as variantes causais e os SNPs genotipados. Estudos incluindo a abordagem de avaliação de escores de risco poligênicos apoiam essa ideia. Por exemplo, em torno de 50 SNPs foram identificados por GWAS associados com altura em humanos, explicando apenas cerca de 5% da variância fenotípica (Weedon et al., 2008; Lettre et al., 2008; Gudbjartsson et al., 2008; Visscher, 2008). Entretanto, ao considerarem os efeitos de todos os SNPs do GWAS simultaneamente, eles foram capazes de explicar 45% da variância e sugeriram que a maior parte da herdabilidade não está perdida e sim escondida em SNPs de efeitos muito pequenos para atingirem os níveis de significância (Yang et al., 2010).

Por outro lado, há quem defenda que a compreensão da herdabilidade perdida passa pela investigação dos efeitos epistáticos das interações gênicas. Zuk et al. (2012) sugerem que não levar em consideração os efeitos epistáticos no cálculo da herdabilidade de um determinado fenótipo resulta em uma superestimativa da herdabilidade total e conseqüente subestimativa da parcela dessa herdabilidade explicada pelas variantes conhecidas, ampliando o fenômeno da herdabilidade perdida. Assim, mesmo quando todas as variantes que afetam um determinado fenótipo forem descobertas, a herdabilidade explicada por elas pode não chegar a 100%, fenômeno conhecido como “herdabilidade fantasma” (Zuk et al., 2012).

A importância do efeito de interações epistáticas vem ganhando destaque e grande empenho tem sido investido na elaboração e aprimoramento de novos métodos analíticos para a investigação desses efeitos em dados de GWAS (Zhu et al., 2013; Okser et al., 2013). No entanto, fica claro que a busca por interações entre todas as possíveis combinações de SNPs dos GWAS, além de ser computacionalmente limitante, implicaria na obtenção de amostras de tamanhos exorbitantes e em correções estatísticas para múltiplos testes (que visam reduzir o número de falsos-positivos) que raramente permitiriam a sobrevivência de

alguma associação significativa (provocando um aumento do número de falsos-negativos). Assim, muitas das novas abordagens que vêm sendo desenvolvidas estão baseadas no uso de evidências estatísticas e/ou biológicas *a priori* visando selecionar um número reduzido de marcadores genéticos para serem testados nas interações (revisão em Ritchie, 2011; Liu et al., 2012; Nazarian et al., 2012).

2.2.1 Receptores de Dopamina D2 e D4: Heteromerização e Epistasia

Além do *DRD2*, um dos genes mais investigados atualmente em estudos de transtornos psiquiátricos e de variações normais do comportamento é o gene que codifica o receptor de dopamina D4 (*DRD4*). Assim como o *DRD2*, ele está localizado no cromossomo 11, mas encontra-se na região 11p.15.5, e é composto por quatro éxons (Figura 1). Os receptores de dopamina D4 são preferencialmente expressos na áreas estriatais do cérebro e no córtex pré-frontal, de forma pré- ou pós-sináptica, e onde podem estar co-localizados com os receptores de dopamina D2 (de Almeida e Mengod, 2010; Svingos et al., 2000, Rivera et al., 2002; De Mei et al., 2009). Evidências sugerem ainda que tanto os receptores D4 quanto D2 (especialmente D2S) podem encontrar-se localizados em terminais glutamatérgicos córtico-estriatais (Tarazi et al., 1998, Svingos et al., 2000, De Mei et al., 2009).

O polimorfismo mais estudado do *DRD4* corresponde a um conjunto de 48 pares de base (pb) que apresenta-se em número variável de repetições em tandem (VNTR, do inglês *variable number of tandem repeats*). Conhecido como VNTR de 48-pb do *DRD4*, esse polimorfismo está localizado no éxon 3 do *DRD4* e, na proteína codificada, corresponde a uma porção da terceira alça citoplasmática (Asghari et al, 1995). O número de repetições desse VNTR de 48-pb pode variar de 2 a 11, sendo os alelos de 2, 4 e 7 repetições (*DRD4-2R*, *DRD4-4R* e *DRD4-7R*, respectivamente) os mais comuns. Estudos *in vitro* indicam que a funcionalidade, ou seja, a resposta à dopamina, do alelo *DRD4-7R* seria de duas a três vezes menor do que a do alelo *DRD4-4R* e que o alelo

DRD4-2R apresentaria funcionalidade intermediária (Asghari et al., 1995). No entanto, estas diferenças funcionais entre o alelo DRD4-7R e as demais variantes ainda não estão completamente elucidadas.

O VNTR de 48-pb do *DRD4* foi primeiramente associado com a variabilidade normal da dimensão de Procura por Novidades (Ebstein et al., 1996), estando o alelo DRD4-7R associado com escores elevados desta dimensão. Esse achado foi posteriormente replicado por dezenas de estudos e contestado por tantos outros, de forma que meta-análises não apoiam tal associação (Schinka et al., 2002; Kluger et al., 2002; Munafò et al., 2008). Um dos achados mais robustos envolvendo este VNTR de 48-pb refere-se a seu papel no TDAH, tendo pelo menos quatro meta-análises apoiando a associação do DRD4-7R com o TDAH (Faraone et al., 2001; Li et al., 2006; Gizer et al., 2009; Smith, 2010).

Embora tanto o *DRD2* quanto o *DRD4* sejam frequentemente alvo de intensas investigações, os resultados de tais estudos, via de regra, são bastante inconsistentes, indicando forte heterogeneidade entre os achados. Alguns estudos, inclusive, já sugeriram a presença de interações epistáticas envolvendo estes dois genes, o que poderia, por sua vez, ajudar a explicar parte dos resultados incongruentes. Efeitos epistáticos foram associados com TC em adolescentes do sexo masculino e com TPAS em homens adultos (Beaver et al., 2007). Evidências de interação entre os genes *DRD2* e *DRD4* foram também sugeridas como tendo efeito na performance de um teste que avalia impulsividade comportamental (DDT – do inglês, *Delay Discounting Task*) (Eisenberg et al., 2007). No entanto, para investigar o efeito de interações epistáticas entre estes dois genes dopaminérgicos, estes estudos avaliaram o polimorfismo Taq1A como marcador do *DRD2*. Como o SNP Taq1A está de fato localizado no gene *ANKK1* e, até o momento, não há evidências de que ele represente um SNP funcional que exerça um efeito direto sobre o *DRD2*, torna-se mais plausível que o Taq1A, na verdade, esteja refletindo os efeitos de um ou mais polimorfismos funcionais do *DRD2* que estejam em desequilíbrio de ligação (moderada a forte) com ele.

Como mencionado anteriormente, o gene *DRD2* codifica duas isoformas, que apresentam localização e funções distintas e que diferem em 29 aminoácidos: a forma curta D2S, com localização pré-sináptica e função de auto-receptor e a forma longa D2L, com localização e função pós-sináptica (Usiello et al., 2000). Foi identificado que dois SNPs do gene *DRD2*, rs2283265 e rs1076560, os quais encontram-se em muito forte/total desequilíbrio de ligação, são capazes de interferir no processo de *splicing* alternativo, e assim, modular a taxa de D2S/D2L expressa (Zhang et al., 2007). Os alelos menos frequentes destes dois SNPs favorecem a inclusão do 6^o éxon e assim reduzem a expressão da isoforma curta D2S em relação à longa D2L. Usando a técnica de análise de imagens de ressonância magnética funcional (fMRI, do inglês *functional magnetic resonance imaging*) tais alelos foram associados com aumento da atividade no estriado e córtex pré-frontal durante testes de memória de trabalho e com reduções de performances de memória de trabalho e controle de atenção (Zhang et al., 2007). Há evidências também de que esses alelos representam fatores de risco em casos de overdose por cocaína (Moyer et al., 2011).

Recentemente, estudos desenvolvidos por Borroto-Escuela et al. (2011) e González et al. (2012), utilizando múltiplas abordagens *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*, identificaram que os receptores de dopamina D2 e D4 são capazes de formar heterômeros e que variantes destes receptores são capazes de interferir nesse processo de heteromerização. Borroto-Escuela et al. (2011) avaliaram a capacidade e eficiência do processo de heteromerização entre a isoforma D2L e as três variantes mais comuns do DRD4 geradas pelo VNTR de 48-pb (DRD4-2R, DRD4-4R e DRD4-7R). Os resultados obtidos indicam que o D2L é capaz de formar heterômeros com as três principais variantes do DRD4, sendo esse processo de heteromerização menos eficiente com o DRD4-7R. Além disso, interações alostéricas foram observadas nos heterômeros D2L–DRD4-2R e D2L–DRD4-4R, indicando a existência de um efeito potencializador desta interação entre receptores nesses heterômeros (Borroto-Escuela et al., 2011).

Por outro lado, González et al. (2012), avaliaram esse processo de heteromerização entre o receptor D2 e as principais variantes do DRD4 focando na isoforma D2S (auto-receptor). Eles demonstram que enquanto DRD4-2R e

DRD4-4R são capazes de formar heterômeros com o D2S, o mesmo não ocorre com o DRD4-7R. Os autores revelam ainda que, tanto em células transfectadas quanto do estriado de camundongos, a co-estimulação dos receptores D2S e D4 nos heterômeros D2S–DRD4 tem um efeito sinérgico, potencializando a via de sinalização, mas esse efeito não ocorre em células expressando DRD4-7R.

Além disso, é demonstrado pela primeira vez que interações dos receptores D2S–DRD4 modulam a liberação de glutamato estriatal, sugerindo que os heterômeros D2S-DRD4 permitem que a dopamina faça um ajuste fino na neurotransmissão glutamatérgica (González et al., 2012). É sugerido que, em baixas concentrações, a dopamina se ligaria aos receptores D4 (com os quais tem mais afinidade; Rondou et al., 2010) inibindo a liberação de glutamato; no entanto, concentrações elevadas de dopamina ativariam também D2S e assim, a interação sinérgica dos heterômeros D2S-DRD4 seria capaz de produzir uma inibição ainda mais robusta da liberação de glutamato (González et al., 2012). Os autores sugerem que a presença da variante DRD4-7R implica em um controle mais fraco da neurotransmissão glutamatérgica e que esse poderia ser um dos mecanismos envolvidos tanto na patofisiologia do TDAH quanto na variabilidade de resposta ao tratamento com psico-estimulantes (os quais elevam as concentrações de dopamina) (González et al., 2012).

Dessa forma, é possível supor que os SNPs rs2283265 e rs1076560 que modulam o *splicing* alternativo do gene *DRD2* interfiram na taxa de heteromerização entre os receptores de dopamina D2 e D4. Com base no efeito desses polimorfismos na expressão diferencial das isoformas do DRD2, as quais interagem de maneiras distintas com as principais variantes do DRD4, é bastante plausível inferir eles estejam diretamente envolvidos na modulação dos efeitos epistáticos dos genes *DRD2* e *DRD4*, sendo que estes efeitos representariam, ao menos em parte, um reflexo das variações na eficiência do processo de heteromerização dos receptores D2 e D4.

A presença de interações entre os genes *DRD2* e *DRD4* influenciando diretamente manifestações clínicas de transtornos relacionados ao sistema dopaminérgico poderia contribuir para explicar, ao menos em parte, a forte

heterogeneidade característica dos estudos envolvendo o gene *DRD2*. Como mencionado, a grande maioria das centenas de estudos de associação com o gene *DRD2* utilizou como marcador genético o SNP Taq1A, o qual está em desequilíbrio de ligação parcial com vários polimorfismos do *DRD2* (Figura 3), e não considerou o possível efeito de interações epistáticas envolvendo o *DRD2*. Com os achados de Borroto-Escuela et al. (2011) e González et al. (2012), pode-se sugerir a hipótese de que as inconsistências marcantes entre os resultados de associação do Taq1A poderiam estar refletindo o fato de ele servir como marcador de variantes funcionais gene *DRD2*, as quais, por sua vez, interagem com variantes do *DRD4* e tais achados poderiam estar sendo modulados por alterações no processo e eficiência de heteromerização desses dois receptores dopaminérgicos.

Sendo essa hipótese verdadeira, é possível também testar se tais manifestações clínicas moduladas por interações epistáticas entre os genes *DRD2* e *DRD4* podem ser detectadas em diferentes etapas de desenvolvimento da vida do indivíduo. De um ponto de vista genético, é bastante plausível que as mesmas influências genéticas sejam manifestadas como transtornos distintos durante as diferentes fases do desenvolvimento (manifestação heterotípica, descrita na *Seção 1. Transtornos Psiquiátricos*).

2.3 O Complexo Gênico NTAD (*NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2*)

Como vem sendo descrito ao longo dessa tese, um grande número de estudos tem tradicionalmente avaliado o papel do gene *DRD2* em transtornos psiquiátricos, com resultados bastante inconsistentes para a maioria dos fenótipos em estudo. Uma vez identificado que o SNP mais estudado (Taq1A) relacionado ao *DRD2* de fato pertence ao gene vizinho *ANKK1*, este passou também a receber um interesse maior nos estudos de associação. Além do complexo *ANKK1/DRD2*, dois outros genes localizados na vizinhança imediata revelaram-se fortes genes candidatos para o estudo de manifestações clínicas relacionadas ao comportamento, em especial ao TUS. Os genes *NCAM1* (*Neural Cell Adhesion Molecule 1*) e *TTC12* (*Tetratricopeptide Repeat Domain 12*), juntamente com os genes *ANKK1* e *DRD2* formam um agrupamento gênico de cerca de 520kb na região cromossômica 11q22-23 e são coletivamente chamados de complexo gênico NTAD (*NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2*) (Figura 3).

Análises genômicas indicam que pares de genes vizinhos tendem a ter padrões de expressão similares e que genes com funções relacionadas têm uma tendência a localizarem-se próximos ao longo do cromossomo (Cohen et al., 2000). Genes co-regulados também são encontrados em maior proximidade do que o esperado ao acaso, muitas vezes, inclusive como genes adjacentes (Janga et al., 2008; Arnone et al., 2012).

No caso em estudo, há evidências de que a expressão de um dos genes (*DRD2*) do complexo gênico NTAD é modulada por variações em outro gene (*ANKK1*) deste mesmo agrupamento (Hoenicka et al., 2010). Além disso, há indícios de que os quatro genes que compõem o complexo gênico NTAD estão, independentemente e/ou em conjunto, envolvidos na susceptibilidade a transtornos psiquiátricos, mais especificamente, ao TUS (Gelernter et al., 2006; Yang et al., 2007; 2008; David et al., 2010; Ducci et al., 2011; Nelson et al., 2013).

A seguir é apresentada uma breve descrição de cada um dos genes com ênfase nos seus principais resultados.

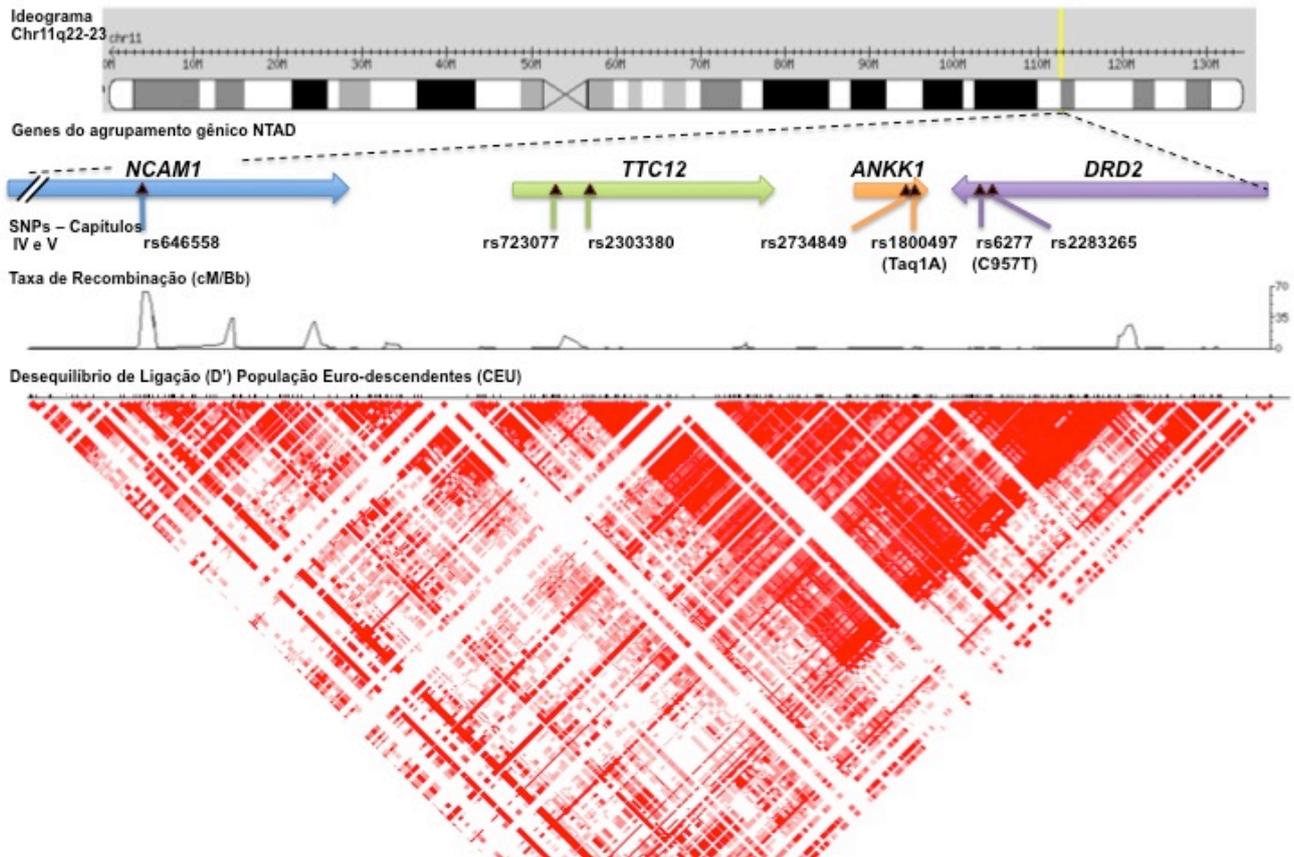


Figura 3. Representação esquemática da região cromossômica 11q22-23, com o posicionamento dos genes do agrupamento NTAD: *NCAM1* (317kb), *TTC12* (69KB), *ANKK1* (13kb) e *DRD2* (66kb). O Ideograma representa o cromossomo 11 e a região 11q22-23 (marcada pelo traço vertical amarelo) está expandida abaixo para representar o posicionamento e orientação de transcrição dos genes do agrupamento NTAD. Por motivos ilustrativos, o gene *NCAM1* está parcialmente representado. Os pequenos triângulos identificados nos genes referem-se ao SNPs estudados nos Capítulos 4 e 5 da presente Tese. Representações da taxa de recombinação ao longo desta região e a estrutura de desequilíbrio de ligação (D' ; apresentada na forma de triângulo invertido onde quando mais intensa a cor maior o desequilíbrio) foram obtidas pelo programa Haploview (Barrett et al., 2005).

2.3.1 Características Individuais Dos Genes Do NTAD

- *Neural Cell Adhesion Molecule 1 (NCAM1)*

O gene *NCAM1* é um gene extenso, com aproximadamente 317kb e contendo pelo menos 19 éxons, e está localizado na região 11q23.2, tendo sua extremidade 3' próxima a extremidade 5' do gene *TTC12* (coordenadas genômicas GRCh37: 11:112,831,968 – 113,149,157) (Figura 3).

A proteína codificada pelo gene *NCAM1* (NCAM) é amplamente expressa no sistema nervoso, onde localiza-se na superfície celular de células neuronais e tem função importante para o desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso (revisão em Walmod et al., 2004). Durante os primeiros 30 anos após a identificação da proteína NCAM, ela era definida apenas como uma mediadora da adesão celular via ligação com outras moléculas NCAM (Rutishauser e Goridis, 1986). No entanto, atualmente ela é considerada também um receptor de transdução de sinal que interage com uma ampla gama de moléculas, modulando assim processos biológicos como adesão celular, migração, proliferação, diferenciação, sobrevivência e plasticidade sináptica (revisão em Walmod et al., 2004; Hansen et al., 2008).

Esse gene é capaz de codificar múltiplas isoformas a partir de *splicing* alternativo e alterações pós-traducionais; dentre as isoformas mais conhecidas, a NCAM-140 e a NCAM-180 são proteínas trans-membranas com um domínio citoplasmático variável enquanto a NCAM-120 está ligada por uma âncora à membrana celular. Além destas isoformas geradas por *splicing* alternativo, outra isoforma bastante investigada, a PSA-NCAM, resulta da adição pós-traducional do ácido poli-siálico (PSA) na molécula de NCAM e parece ter propriedades de adesão reduzidas, favorecendo processos de plasticidade estrutural neuronal (Sato e Kitajima 2013; Nacher et al., 2013).

Variações nos níveis de expressão e no processo de *splicing* de NCAM já foram associadas com transtornos psiquiátricos como Transtorno Bipolar (Atz et

al., 2007), Transtorno Depressivo Maior (Tochigi et al., 2008), Esquizofrenia (Vawter et al., 2000; Gibbons et al., 2009) dentre outros (revisão em Vawter 2000; Gnanapavan e Giovannonni, 2013), assim como com sintomas depressivos e de ansiedade em modelos animais (Stork et al., 1999; Stork et al., 2000; Aonurm-Helm et al., 2008; Bisaz e Sandi, 2012; Jurgenson et al., 2012).

O envolvimento do gene *NCAM1* em fenótipos tradicionalmente associados a funções dopaminérgicas poderia ser também explicado por evidências que vinculam a funcionalidade da NCAM ao sistema dopaminérgico através dos receptores D2. Já foi sugerido que a ativação de receptores D2 possa induzir a expressão da isoforma PSA-NCAM (Castillo-Gómez et al., 2008) e que esta modulação possa ter um papel central na plasticidade estrutural de circuitos inibitórios no cérebro (Castillo-Gomez et al., 2011). Os níveis de expressão de PSA-NCAM parecem estar alterados em indivíduos com Esquizofrenia, Transtorno Depressivo Maior e Transtorno Bipolar (Varea et al., 2012; Nachter et al., 2013, Wainwright e Galea 2013) e sua expressão está relacionada a sintomas correspondentes em modelos animais (Tsoory et al., 2008). Por outro lado, foi demonstrado que a NCAM é capaz de regular a sinalização dos receptores D2 ao promoverem a internalização e subsequente degradação destes receptores (Xiao et al., 2009).

Estudos genéticos apontam que SNPs e haplótipos do gene *NCAM1* estão associados com a susceptibilidade ao Transtorno por Uso de Álcool (Yang et al., 2007); Transtorno Bipolar (Arai et al., 2004; Atz et al., 2007) e Esquizofrenia (Atz et al., 2007; Sullivan et al., 2007). Um SNP em particular, o rs646558 localizado no íntron 13 (Figura 3), destaca-se por ter sido associado, individualmente ou em haplótipos, com todos esses transtornos anteriormente citados (Arai et al., 2004; Atz et al., 2007; Yang et al., 2007).

- *Tetratricopeptide Repeat Domain 12 (TTC12)*

O gene *TTC12* contém 22 éxons, compreendendo cerca de 69kb, e está localizado entre os genes *NCAM1* e *ANKK1* (Figura 3). Este gene codifica uma proteína de 705 aminoácidos que possui um domínio proteico com repetições de

tetratricopeptídeos e três domínios de repetição *Armadillo* (Katoh e Katoh, 2003). Sua função permanece ainda pouco conhecida, no entanto, a presença de motivos proteicos de repetições *Armadillo* indica que possa estar relacionada a uma variedade de processos celulares, incluindo adesão celular, neurogênese e na via de sinalização Wnt-Beta-catenina (Katoh e Katoh, 2003). Sabe-se que a dopamina interage com Beta-cateninas na via de sinalização Wnt, modulando o desenvolvimento de neurônios dopaminérgicos (Castelo-Branco e Arenas, 2006). Assim, é sugerido que as funções do *TTC12* possam estar relacionadas com as funções dos genes *DRD2* e *NCAM1* na transmissão dopaminérgica e no neurodesenvolvimento (Yang et al., 2007).

Estudos genéticos vêm apresentando fortes associações de polimorfismos do gene *TTC12* com fenótipos relacionados a TUS, como por exemplo os Transtornos por Uso de Álcool (Yang et al., 2007; 2008), de Nicotina (Gelernter et al., 2006; David et al., 2010; Ducci et al., 2011; Lobo et al., 2012) e de Heroína (Nelson et al., 2013) e também com escores elevados de Procura por Novidades (Ducci et al., 2011), reforçando o *TTC12* como importante gene-candidato a estudos de dependência química ou mesmo de transtornos externalizantes em geral.

O SNP rs2303380 localizado no íntron 7 do *TTC12* (Figura 3) aparece dentre os polimorfismos do NTAD mais fortemente associados com Dependência de Nicotina (Gelernter et al., 2006; Ducci et al., 2011) e parece estar também relacionado à idade de início do tabagismo (Lobo et al., 2012) e à Dependência de Heroína (Nelson et al., 2013). Haplótipos contendo esse SNP também foram associados à Dependência de Nicotina, sendo que possíveis interações com sexo e/ou etnia foram sugeridas (David et al., 2010). Por outro lado, os resultados mais fortes de associação do NTAD com o Transtorno por Uso de Álcool foram encontrados com haplótipos centrados na região do éxon 3 do *TTC12*, tanto em estudos de família como na abordagem de caso-controle (Yang et al., 2007; 2008).

- *Ankyrin Repeat and Kinase Domains containing 1 (ANKK1)*

O gene *ANKK1* é composto por 8 éxons e codifica uma proteína de 765 aminoácidos, a qual está provavelmente envolvida no circuito de transdução de sinal (Neville et al., 2004). Análises de sua sequência proteica identificam forte similaridade entre *ANKK1* e a família de proteínas kinases que interagem com receptores (RIPKs, do inglês *receptor-interacting protein kinases*), as quais estão envolvidas na ativação do fator de transcrição NF-KB (Huang et al., 2009).

Como descrito anteriormente, um dos polimorfismos mais intensamente estudados dentro da genética psiquiátrica, o SNP Taq1A (rs1800497), está situado no gene *ANKK1* (Figura 3). No entanto, além do amplo e tradicional interesse pelo papel do Taq1A na susceptibilidade a transtornos psiquiátricos, outro polimorfismo do gene *ANKK1* foi revelado como altamente promissor para estudo de tais transtornos.

O SNP rs2734849 (G/A) (Figura 3) consiste de uma substituição não-sinônima (Arg490His) que, assim como Taq1A, está localizado no oitavo éxon do gene *ANKK1*, no domínio C-terminal de repetições ankirina. Estudo realizado por Huang et al. (2009) mostrou que o SNP rs2734849 é capaz de alterar os níveis de expressão de genes que são regulados pelo fator de transcrição NF-κB. Eles sugerem que o alelo “A” está associado a uma supressão cerca de 30% maior dos genes regulados por NF-κB do que o alelo “G” (Huang et al., 2009). Foi ainda verificado que o resíduo trocado pelo rs2734849 (Arg490His) está localizado na superfície da proteína, o que seria um pré-requisito para o envolvimento na mediação das interações proteína-proteína dos processos de transdução de sinal que resultam na inibição de atividade por NF-κB.

Esse achado torna-se especialmente interessante uma vez que o fator de transcrição NF-KB é um sinal necessário e suficiente para induzir a expressão do gene *DRD2* (Fiorentini et al., 2002; Bontempi et al., 2007). Assim, os resultados obtidos por Huang et al. (2009) sugerem uma possível conexão entre variações no gene *ANKK1* e expressão do gene *DRD2*. Maior supressão da expressão de

DRD2 leva a uma menor disponibilidade desses receptores em neurônios dopaminérgicos no cérebro, característica previamente associada com a vulnerabilidade ao abuso/dependência de substâncias. De fato, corroborando essa ideia, demonstrou-se que o SNP rs2734849, tanto individualmente quanto compondo haplótipos, está associado à Dependência de Nicotina e a medidas de intensidade/gravidade de tal dependência (Huang et al., 2009).

Além disso, foi também identificado que os promotores dos genes *ANKK1* e *DRD2* apresentam elementos para regulação transcricional idênticos e estudos *in vitro* mostraram que o *ANKK1* é capaz de ser ativado pela apomorfina, a qual é um agonista dopaminérgico (Hoenicka et al., 2010).

- *Dopamine Receptor D2 (DRD2) – Informações Adicionais*

Detalhamentos sobre a estrutura, funcionalidade e associações do gene *DRD2* foram apresentadas anteriormente nas Seções 2.1 – *O Tradicional Receptor de Dopamina D2* e 2.2.1 – *Receptores de Dopamina D2 e D4: Heteromerização e Epistasia*. No entanto, além dos tradicionais estudos abordando o *DRD2* através do SNP Taq1A e das possíveis implicações do SNP rs2283265 em efeitos epistáticos decorrentes de heteromerização, há evidências de que outros SNPs no gene *DRD2* influenciem na vulnerabilidade a transtornos psiquiátricos.

Especial interesse tem sido conferido ao polimorfismo rs6277, mais conhecido como C957T, que está localizado no sétimo éxon do gene *DRD2* e não causa troca de aminoácidos (Pro319Pro). No entanto, ao contrário de ser inócuo, foi demonstrado que esse SNP provoca uma mudança na conformação do mRNA transcrito (Duan et al., 2003). Estudo *in vitro* sugeriu que o alelo T leva a uma diminuição da estabilidade do mRNA e da taxa de expressão de *DRD2* induzida pela presença de dopamina (Duan et al., 2003). Entretanto, subsequentemente, estudos *in vivo* demonstraram que a disponibilidade de *DRD2* em regiões estriatais, ao invés de diminuir, aumenta de forma aditiva de acordo com a presença do alelo T (CC<CT<TT) (Hirvonen et al., 2004; com correção em

Hirvonen et al., 2005; Hirvonen et al., 2009a) ao passo em que essa disponibilidade diminui em regiões extra-striatais de acordo com a presença do mesmo (CC>CT>TT) (Hirvonen et al., 2009b). No entanto, a questão sobre o que representa uma maior ou menor disponibilidade (dependente de variações em densidade e afinidade) desses receptores em diferentes regiões cerebrais e o quanto independente são os efeitos dos polimorfismos rs6277 e Taq1A nessas características, ainda permanece em aberto.

Estudos sugerem a associação do rs6277 com medidas de impulsividade (White et al., 2009; Colzato et al., 2010; 2013), funções executivas (Rodriguez-Jimenez et al., 2006a; Jacobsen et al., 2006), memória de trabalho (Xu et al., 2007), Dependência de Álcool (Ponce et al., 2008), Dependência de Nicotina (Gelernter et al., 2006) e resposta ao tratamento por reposição de nicotina em tabagistas (Lerman et al., 2006; Jacobsen et al., 2006). Há também estudo de meta-análise e estudos posteriores apoiando a associação do rs6277 com Esquizofrenia (Monakhov et al., 2008; Betcheva et al., 2009).

Há quem sugira que algumas características fenotípicas previamente associadas ao polimorfismo Taq1A, na verdade, refletem associações indiretas devido ao seu padrão de desequilíbrio de ligação com o rs6277 (Frank e Hutchison et al., 2009). Por outro lado, interações com efeitos epistáticos entre SNPs rs6277 e Taq1A já foram sugeridas por Ponce et al. (2008), ao indicar que, dentre indivíduos dependentes de álcool, a presença concomitante do alelo A1 do Taq1A e do genótipo CC do rs6277 estava associada a um marcante aumento da incidência do Transtorno de Personalidade Dissocial comparado às outras combinações genotípicas.

Da mesma forma, dois estudos recentes indicaram que indivíduos com os haplótipos A1/A2-C/C ou A1/A2-C/C (Taq1A-rs6277) tinham uma chance mais de três vezes maior de serem dependentes de nicotina (Voisey et al., 2012) ou de álcool (Swagell et al., 2012) do que aqueles sem essas combinações. De fato, dentre as possíveis combinações haplotípicas, o A1/A2-C/C foi identificado como representando o menor potencial de ligação de *DRD2* no estriado (Hirvonen et al., 2009a).

2.3.2 O NTAD Como Unidade Funcional

Visto que há indícios de envolvimento dos quatro genes que formam o complexo gênico NTAD em fenótipos comportamentais, há uma priorização gradual na abordagem desse complexo como uma “unidade funcional”, ao invés de estudar apenas um único gene ou cada um isoladamente. O fato de que blocos haplotípicos não são restritos a barreiras gênicas reforça essa abordagem em conjunto do NTAD. Além disso, estudos vêm sugerindo que múltiplos polimorfismos ao longo do NTAD tenham efeitos independentes sobre um mesmo fenótipo, embora seja bastante plausível que haja um mecanismo ou sistema comum onde esses genes/polimorfismos atuem.

Ao analisar o efeito de 43 SNPs localizados ao longo do NTAD, a região que se estende desde o éxon 3 do *TTC12* (centrada principalmente no rs2303380) e que engloba praticamente todo o *ANKK1* foi identificada como a mais fortemente associada à Dependência de Nicotina, tanto por SNPs individuais como por haplótipos *TTC12-ANKK1* (Gelernter et al., 2006). De maneira similar, estudo subsequente identificou que os SNPs individuais mais fortemente associados com o tabagismo localizavam-se no *TTC12* (rs10502172 e rs2303380), no *ANKK1* (rs2734849) e também no *DRD2* (rs1076563) (Ducci et al., 2011). Eles ainda sugerem que haplótipos da região *TTC12-ANKK1-DRD2* exerçam influência no tabagismo principalmente na adolescência e que estes efeitos sejam parcialmente mediados por dimensões de personalidade (Ducci et al., 2011). Além disso, outros autores sugeriram que os efeitos de haplótipos da região *TTC12-ANKK1* (rs2303380-rs4938015-rs11604671) na Dependência de Nicotina diferem entre homens e mulheres (David et al., 2010).

O papel do NTAD na susceptibilidade à Dependência de Álcool parece também estar fortemente associado a haplótipos envolvendo a região do éxon 3 do *TTC12*, sendo que haplótipos adicionais centrados na região do éxon 12/intron 13 do *NCAM1* e éxons 2 e 5 do *ANKK1* também apresentaram associação com Dependência de Álcool (Yang et al., 2007). Um estudo subsequente avaliou o

papel da comorbidade com dependências de outras substâncias nos achados de associação do NTAD com Dependência de Álcool (Yang et al., 2008). Neste segundo estudo, eles revelam que para a sub-amostra de dependentes de álcool também dependentes de outras drogas, as regiões do éxon 3 do *TTC12* e do éxon12/intron 13 do *NCAM1* continuam estando associadas e identificam uma nova região de susceptibilidade, a qual compreende desde o éxon 8 do *ANKK1* ao éxon 7 do *DRD2* (englobando assim os SNPs TAq1A e rs6277) (Yang et al., 2008). Por outro lado, quando indivíduos que apresentavam comorbidade com dependência de outras substâncias foram excluídos, somente as regiões entre os íntrons 14 e 18 do *NCAM1* e a região da junção entre o *ANKK1* e o *DRD2* apresentaram associação global com Dependência de Álcool. Estes resultados indicam que a presença de comorbidades parece ter uma influência importante na modulação das associações do NTAD com TUS.

Um estudo bastante recente apoia também o importante papel do NTAD no desenvolvimento do TUS (Nelson et al., 2013). Os resultados apontam para o envolvimento dos genes *TTC12* e *ANKK1* na susceptibilidade para a Dependência de Heroína e outras drogas ilícitas e para um efeito secundário independente do gene *NCAM1* nesta susceptibilidade (Nelson et al., 2013).

No entanto, muito embora os achados referentes a associação do complexo gênico NTAD com o TUS vêm se revelando bastante promissores, estudos avaliando conjuntamente o papel dos quatro genes do NTAD na predisposição a outros transtornos psiquiátricos e na variação comportamental normal ainda não foram conduzidos. Desta forma, ainda há muito para ser desvendado em relação à este agrupamento gênico da região cromossômica 11q23 e sua influência na susceptibilidade aos mais variados transtornos psiquiátricos.

Uma vez que meta-análises indicam forte heterogeneidade na associação do polimorfismo Taq1A, localizado no complexo NTAD, com os Transtornos por Uso de Álcool (Munafò et al., 2007; Smith et al., 2008; Le Foll et al., 2009 e Wang et al., 2013) e de Nicotina (Li et al., 2004; Munafò et al., 2004; 2009), bem como com o TDAH (Wu et al., 2012; Gizer et al., 2009), é possível investigar se outras

variações genéticas no complexo NTAD poderiam contribuir para a elucidação deste achado recorrente nas meta-análises.

Além disso, devido a indícios de que polimorfismos do complexo NTAD possam ter um efeito conjunto, surgem também questões a respeito da dinâmica evolutiva desse complexo. Embora cresça o interesse por esclarecer o papel dessa região em fenótipos comportamentais, pouca atenção foi dada ao aspecto evolutivo desse agrupamento gênico.

Um ponto importante a ser abordado é há quanto tempo esses genes estão sendo mantidos com sintonia compartilhada (ou seja, genes no mesmo cromossomo) e sua vizinhança conservada (ou seja, os genes lado-a-lado na mesma ordem) ao longo da trajetória evolutiva. Se esse complexo gênico for uma conformação recente, ou mesmo específica de humanos, ele poderia estar refletindo uma novidade adaptativa do gênero *Homo* (ou da espécie *Homo sapiens*) ou um agrupamento aleatório desses genes. Entretanto, a manutenção de um agrupamento gênico durante um longo período evolutivo é mais difícil de ser explicada unicamente por processos aleatórios. Assim, um complexo antigo poderia também refletir uma estrutura funcional adaptativa e/ou uma evolução orquestrada desses genes, os quais estão envolvidos em processos de neurotransmissão e neurogênese.

2

Capítulo 2

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

“A tarefa não é tanto ver o que ninguém viu ainda, mas pensar o que ninguém pensou sobre aquilo que todo mundo vê”

Arthur Schopenhauer (1788-1860)

Justificativa

Devido ao grande impacto que os transtornos psiquiátricos causam na vida dos indivíduos afetados e da sociedade como um todo, assim como ao forte componente genético envolvido na susceptibilidade a esses transtornos, é inegável a importância de desvendar o papel de fatores específicos que influenciam no seu desenvolvimento. Embora alguns avanços nesse sentido já tenham sido conquistados nas últimas décadas, os estudos genéticos têm esbarrado em dificuldades vinculadas à natureza complexa desses fenótipos. Mesmo as abordagens em larga escala desenvolvidas na última década não permitiram identificar mais do que uma parcela pequena da herdabilidade. Assim, buscamos propor abordagens alternativas que possam auxiliar na identificação de mecanismos e alterações genéticas com papéis relevantes em um conjunto de fenótipos comportamentais relacionados. Mais especificamente, a partir da reconhecida implicação do sistema dopaminérgico na modulação comportamental e da consideração de evidências bioquímicas, fisiológicas e evolutivas prévias, procuramos esclarecer o papel de efeitos epistáticos e de agrupamentos gênicos no desenvolvimento do TDAH, TC e Transtorno por Uso de Álcool. Uma melhor compreensão sobre os mecanismos biológicos envolvidos e das inter-relações desses transtornos poderá permitir a elaboração de estratégias de diagnóstico, prevenção e tratamento mais eficazes para essas doenças.

Objetivos

Objetivo Geral

O objetivo geral da presente Tese é contribuir para a elucidação do papel de fatores genéticos específicos na susceptibilidade e na heterogeneidade clínica do TDAH, TC e Transtorno por Uso de Álcool a partir de abordagens envolvendo efeitos epistáticos e de agrupamento gênico.

Objetivos Específicos

- Com base em evidências recentes sobre os padrões de heteromização dos receptores de dopamina D2 e D4, testar o papel da interação entre os polimorfismos dos genes *DRD2* e *DRD4* implicados nesse processo sobre o desenvolvimento do Transtorno por Uso de Álcool;

- Investigar se os efeitos epistáticos da interação entre os genes *DRD2* e *DRD4* podem ser detectados ainda na infância/adolescência, avaliando o seu papel sobre o Transtorno de Conduta em uma amostra de crianças com TDAH;

- Contribuir no esclarecimento sobre a história evolutiva do complexo gênico NTAD (*NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2*) e seu significado biológico através de análises de genômica comparativa;

- Expandir as análises tradicionalmente focadas no papel do gene *DRD2* na psiquiatria, englobando genes vizinhos a este no intuito de esclarecer a marcante inconsistência dos resultados prévios da literatura.

3

Capítulo 3

DRD2/DRD4 HETEROMERIZATION MAY INFLUENCE GENETIC SUSCEPTIBILITY TO ALCOHOL DEPENDENCE

Molecular Psychiatry (2013) 18, 401-402

doi: 10.1038/mp.2012.50

Altogether, herein we show that alterations in 5HT_{1B}-receptor density are differentially linked to a novel, five-factor model of PTSD symptoms, and may therefore explain aspects of the clinical phenotype of this disorder. These data have important implications for understanding the typically complex phenomenology of PTSD and may help inform theoretical models of PTSD symptom dimensionality, as well as approaches to assessment and treatment.

CONFLICT OF INTEREST

RHP is a consultant to CogState. JHK has been a consultant to Aisling Capital LLC; AstraZeneca Pharmaceuticals; Brinncall & Nicolini; Easton Associates, LLC; Gilead Sciences; GlaxoSmithKline; Ortho-McNeil-Janssen Pharmaceuticals; Lundbeck Research USA; Merz Pharmaceuticals GmbH; MK Medical Communications; Pfizer; F Hoffmann–La Roche; SK Holdings; Takeda Pharmaceutical; Teva Pharmaceutical Industries and Transcept Pharmaceuticals. SH, SMS and AN declare no conflict of interest.

RH Pietrzak^{1,2}, S Henry^{1,2}, SM Southwick^{1,2}, JH Krystal^{1,2}
and A Neumeister³

¹National Center for Posttraumatic Stress Disorder, Clinical
Neurosciences Division, VA Connecticut Healthcare System,
West Haven, CT, USA;

²Department of Psychiatry, Yale University School of Medicine, West
Haven, CT, USA and

³Department of Psychiatry and Radiology, New York University
School of Medicine, New York, NY, USA
E-mail: alexander.neumeister@nyumc.org

REFERENCES

- Sari Y. *Neurosci Biobehav Rev* 2004; **28**: 565–582.
- Murrough JW, Czeremak C, Henry S, Nabulsi N, Gallezot JD, Gueorguieva R *et al. Arch Gen Psychiatry* 2011; **68**: 892–900.
- Murrough JW, Huang Y, Hu J, Henry S, Williams W, Gallezot JD *et al. Biol Psychiatry* 2011; **70**: 1033–1038.
- Bibancos T, Jardim DL, Aneas J, Chiavegatto S. *Genes Brain Behav* 2007; **6**: 529–539.
- Elhai JD, Biehn TL, Armour C, Klopper JJ, Frueh BC, Palmieri PA. *J Anxiety Disord* 2011; **25**: 340–345.
- Wang L, Zhang J, Shi Z, Zhou M, Li Z, Zhang K *et al. J Anxiety Disord* 2011; **25**: 771–776.
- Pietrzak RH, Tsai J, Harpaz-Rotem I, Whealin JM, Southwick SM. *J Psychiatr Res* 2012; **46**: 317–322.
- Morikawa H, Manzoni OJ, Crabbe JC, Williams JT. *Mol Pharmacol* 2000; **58**: 1271–1278.
- Hoebel BG, Avena NM, Rada P. *Curr Opin Pharmacol* 2007; **7**: 617–627.
- Lopes AP, da Cunha IC, Steffens SM, Ferraz A, Vargas JC, de Lima TC *et al. Behav Brain Res* 2007; **184**: 142–149.

DRD2/DRD4 heteromerization may influence genetic susceptibility to alcohol dependence

Molecular Psychiatry (2013) **18**, 401–402; doi:10.1038/mp.2012.50;
published online 8 May 2012

A major limitation of candidate gene studies in psychiatric genetics is the lack of evidence-based hypotheses for the study of gene–gene interactions. An emerging field that may provide such evidence is the analyses of oligomerization of G-protein-coupled

receptors such as dopamine receptors (DRs). It has recently been shown that *DRD4* and *DRD2* are able to form heteromers and that specific variants in both genes may interfere in this process.^{1,2} We wondered if this heteromerization process might help to elucidate the controversial but repeated findings regarding *DRD4* and *DRD2* genes in some behavioral phenotypes.

DRD4 gene has a well-studied 48-bp variable number tandem repeat (VNTR) polymorphism in exon 3. The most common variants are 2-, 4- and 7-repeats (2R, 4R and 7R, respectively), with the last one being frequently associated with psychiatric disorders. *DRD2* is expressed in two distinct isoforms, the short variant named D₂₅ (mainly presynaptic) and the long variant named D_{2L} (mainly postsynaptic). The balanced expression of both isoforms may be disrupted by the *DRD2* rs2283265 single-nucleotide polymorphism (SNP), where the minor T allele favors the inclusion of the sixth *DRD2* exon, switching D₂₅/D_{2L} balance toward the long form.³ This allele has been associated with reduced working memory and attention control³ and with cocaine abuse.⁴

Gonzalez *et al.*,² on a recent *Molecular Psychiatry* article, observed that the short D₂₅ is capable of forming heteromers with *DRD4* 2R and 4R, but not with the 7R variant. Additionally, Borroto-Escuela *et al.*¹ showed that the long D_{2L} may form heteromers with all three main *DRD4* variants, although it is less effective with the 7R variant. Based on these data, we tested if this functional interaction between molecules could be modulating previous genetic findings regarding alcohol dependence. We hypothesized that the effects of the presence of the *DRD4* 7R risk allele could be enhanced or attenuated according to the presence of the *DRD2* T allele (as in T allele carriers an increased expression of the D_{2L} isoform would be expected).

We tested if there is an interaction effect between the *DRD4* 7R variant and the *DRD2* rs2283265T allele on the susceptibility to alcohol dependence. The *DRD4* VNTR genotypes were obtained as described by Roman *et al.*⁵ (where a description of allele frequencies for this sample is available). Subjects with rare alleles (not 2R, 4R or 7R) were excluded from all analyses, because in these cases no information on the heteromerization pattern is available. *DRD2* rs2283265 SNP was genotyped by Taqman allelic discrimination assay (frequencies for the G and T allele are 0.81 and 0.19, respectively). Subjects were classified according to the presence of *DRD4* 7R (7R carriers) and *DRD2* T (T carriers) alleles. All subjects included are Brazilian adult males of European descent, and the final sample size was of 104 patients with alcohol dependence and 259 healthy blood donor controls. A replication sample of 192 attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) male patients, with information for comorbid alcoholism was also used. Both samples were diagnosed following DSM-IV criteria (detailed descriptions can be found in Bau *et al.*⁶ and Grevet *et al.*⁷).

The logistic regression model revealed a significant interaction effect (likelihood ratio test, $P=0.002$) between the studied polymorphisms. The estimation of odds ratio in the presence of interaction was performed by separating the logits at the two levels of the risk factor, followed by computing the exponentiated value of the difference between the two logits.⁸ The odds ratio estimation (95% confidence interval) of alcohol dependence for the presence of *DRD4* 7R allele in GG homozygotes (T noncarriers) was 1.33 (0.75–2.34). This same estimation in T carriers was 0.26 (0.10–0.66). These results are consistent with the heteromerization-based hypothesis, showing a different effect of *DRD4* variants according to the concomitant presence of either the *DRD2* GG genotype (balanced expression of D₂₅/D_{2L}) or the presence of the T allele (increased expression of D_{2L}). Among 7R carriers, 82.5% of patients with alcohol dependence are GG homozygotes (as opposed to 61.9% of controls), whereas among 7R noncarriers, 54.7% of patients present GG genotype (as opposed to 67.8% of controls). No main effect of *DRD4* 7R variant or *DRD2* T allele on alcohol dependence was observed, which may be explained by

the opposite effect of each marker according to the presence of the other.

We were able to replicate these results in an independent sample of 192 Brazilian adult male ADHD patients of European descent, of whom 39 have comorbid alcohol abuse/dependence. Again, there is a significant gene–gene interaction effect (likelihood ratio test, $P=0.033$) on alcohol abuse/dependence. The odds ratio estimation pointed in the same direction as in the non-ADHD sample, with the odds ratio for the presence of the 7R allele being 0.33 (0.08–1.36) in T allele carriers and 1.86 (0.79–4.41) in patients with the GG genotype.

Interestingly, our results suggest that the concomitant presence of both *DRD2* and *DRD4* risk alleles may confer a protective effect. Considering that the presence of 7R implies a less efficient heteromerization process,¹ it is possible that the presence of both *DRD4* 2R and/or 4R alleles, fully heteromerizing with the overexpressed D_{2L} and therefore further activating it, might confer a higher risk than the presence of at least one 7R allele.

It should be noted that no principal or interaction effect of these markers on ADHD itself was observed in this sample. This effect on alcohol dependence is consistent with the impaired control of glutamatergic neurotransmission entailed by dysfunctional heteromerization,² as this pathway is a key factor in alcohol dependence, modulating both euphoric and dysphoric effects of alcohol consumption.⁹

The findings of Gonzalez *et al.*² and Borroto-Escuela *et al.*¹ may represent a turn point in the study of these dopamine receptors and gene–gene interactions as a whole. We add to this new perspective by showing a clinically relevant effect of an interaction between *DRD4* 7R and *DRD2* T alleles. Literally, hundreds of studies have addressed the association of *DRD2* in alcoholism, and several with *DRD4*, with conflicting results. Therefore, our findings should also be further validated in larger samples. This may be a time for reappraisal of all these findings.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the following Brazilian funding agencies: CNPq, CAPES, FAPERGS and DECIT/SCTIE/MS/PPSUS.

NR Mota¹, DL Rovaris¹, GP Bertuzzi¹, V Contini¹, ES Vitola², EH Grevet², T Roman¹, SM Callegari-Jacques^{1,3}, MH Hutz¹ and CHD Bau¹

¹Department of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

²Department of Psychiatry, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil and

³Department of Statistics, Instituto de Matemática, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
E-mail: claiton.bau@ufrgs.br

REFERENCES

- Borroto-Escuela DO, Van Craenenbroeck K, Romero-Fernandez W, Guidolin D, Woods AS, Rivera A *et al.* *Biochem Biophys Res Commun* 2011; **404**: 928–934.
- Gonzalez S, Rangel-Barajas C, Peper M, Lorenzo R, Moreno E, Ciruela F *et al.* *Mol Psychiatry* advance online publication, 16 August 2011; doi:10.1038/mp.2011.93 (e-pub ahead of print).
- Zhang Y, Bertolino A, Fazio L, Blasi G, Rampino A, Romano R *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 20552–20557.
- Moyer RA, Wang D, Papp AC, Smith RM, Duque L, Mash DC *et al.* *Neuropsychopharmacology* 2011; **36**: 753–762.
- Roman T, Bau CHD, Almeida S, Hutz MH. *Addict Biol* 1999; **4**: 203–207.
- Bau CHD, Almeida S, Hutz MH. *Am J Med Genet* 2000; **96**: 302–306.
- Grevet EH, Bau CHD, Salgado CA, Fischer AG, Kalil K, Victor MM *et al.* *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2006; **256**: 311–319.
- Hosmer D, Lemeshow S. Wiley-Interscience Publication: New York, USA, 2000.
- Krystal JH, Petrakis IL, Mason G, Trevisan L, D'Souza DC. *Pharmacol Ther* 2003; **99**: 79–94.

Dopamine D4 receptor gene variation impacts self-reported altruism

Molecular Psychiatry (2013) **18**, 402–403; doi:10.1038/mp.2012.49; published online 8 May 2012

In this journal, Bachner-Melman *et al.*¹ reported that the 48-bp variable number of tandem repeat in the third exon of the dopamine D4 receptor (*DRD4* VNTR) is associated with self-reported altruism. Despite mounting evidence for a role of dopamine in prosocial behavior,^{2–4} this result has not been replicated yet, perhaps because of the rare usage of the applied Selflessness Scale. Here, we report a conceptual replication of the association between *DRD4* VNTR and altruism measured with the well-established Revised NEO Personality Inventory (NEO-PI-R; see Strobel *et al.*²).

Social decision making is impaired in various neuropsychiatric disorders.⁵ The increasing interest in its neurobiological underpinnings has implicated dopaminergic brain regions (dorsal and ventral striatum, prefrontal and cingulate cortex) in prosocial decisions.² Furthermore, dopaminergic function is supposed to mediate the well-studied influence of oxytocin and arginine vasopressin on social behavior by functional interactions in the limbic reward circuit.^{5,6} Among the dopaminergic genes, *DRD4* and the gene encoding the dopamine downgrading *catechol-O-methyltransferase* (*COMT*) are prevalent in limbocortical regions^{2,3} implicated in altruism.² Associations of *DRD4* VNTR were observed with Selflessness Scores¹ and laboratory altruistic decisions.³ For *COMT*, associations of the Val158Met variant (rs4680) with neural activation during altruistic decisions² and the amount of charitable donations were reported.⁴

Nonetheless, the behavioral and imaging studies did not address a modulation of trait altruism, perhaps because of the smaller sample sizes compared with Bachner-Melman *et al.*¹ Thus, the aim of this study was to test for associations of *DRD4* VNTR and *COMT* Val158Met with altruism self-reports. Instead of the Selflessness Scale,¹ we employed the widely used inventory NEO-PI-R in order to facilitate further replications. The NEO-PI-R measures five personality dimensions including Agreeableness with Altruism as a lower-level trait that conceptually highly overlaps with the Selflessness Scale and that covaries with laboratory altruistic decisions.²

A total of 785 (246 males) nonrelated healthy volunteers of middle-European decent with a mean age of 23.1 ± 4.5 years completed the German NEO-PI-R version in our lab. The sample included 529 (121 males) students with a mean age of 21.7 ± 3.5 years (subsample 1) and 256 (125 males) local residents with a mean age of 25.9 ± 4.9 years (subsample 2). The polymorphisms were genotyped as previously described.^{2,7} Genotype frequencies did not deviate from Hardy–Weinberg equilibrium (*DRD4* VNTR: $\chi^2_{36} = 38.55$; *COMT* Val158Met: $\chi^2_1 = 3.49$, all $P > 0.05$).

Analyses of variance (ANOVAs) with gender as a covariate due to higher altruism scores in females ($P < 0.001$; age nonsignificant) revealed significant higher altruism scores in subjects lacking the 7-repeat variant of *DRD4* (7R–) versus 7-repeat carriers (7R+) in the total sample ($F_{1,784} = 14.256$, $P = 0.0002$, $\eta^2 = 0.018$) and both subsamples (see Table 1). Contrasting the most frequent genotypes, subjects homozygous for the 4-repeat variant (4/4) tended to score higher than 4/7 carriers, with statistical significance in the total sample ($F_{1,555} = 7.329$, $P = 0.007$, $\eta^2 = 0.013$) and the student subsample (see Table 1). Neither an interaction with *COMT* Val158Met nor a main effect of *COMT* Val158Met was revealed (data not shown).

4

Capítulo 4

ASSOCIATION BETWEEN *DRD2/DRD4* INTERACTION AND CONDUCT DISORDER: A POTENTIAL DEVELOPMENTAL PATHWAY TO ALCOHOL DEPENDENCE

*American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric
Genetics (2013) 162(6): 546-549*

DOI 10.1002/ajmg.b.32179

Association Between *DRD2/DRD4* Interaction and Conduct Disorder: A Potential Developmental Pathway to Alcohol Dependence

Nina R. Mota,^{1,2*} Claiton H. D. Bau,¹ Tobias Banaschewski,³ Jan K. Buitelaar,⁴ Richard P. Ebstein,⁵ Barbara Franke,^{6,7} Michael Gill,⁸ Jonna Kuntsi,² Iris Manor,⁹ Ana Miranda,¹⁰ Fernando Mulas,¹¹ Robert D. Oades,¹² Herbert Roeyers,¹³ Aribert Rothenberger,¹⁴ Joseph A. Sergeant,¹⁵ Edmund J. Sonuga-Barke,^{13,16} Hans-Christoph Steinhausen,^{17,18,19} Stephen V. Faraone,^{20,21} and Philip Asherson^{2**}

¹Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

²King's College London, Institute of Psychiatry, MRC Social Genetic and Developmental Psychiatry Centre, London, United Kingdom, UK

³Department of Child and Adolescent Psychiatry and Psychotherapy, Central Institute of Mental Health, Medical Faculty Mannheim, University of Heidelberg, Mannheim, Germany

⁴Department of Cognitive Neuroscience, Donders Institute for Brain, Cognition and Behavior, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands

⁵Psychology Department, National University of Singapore, Singapore, Singapore

⁶Department of Psychiatry, Donders Institute for Brain, Cognition and Behavior, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands

⁷Department of Human Genetics, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands

⁸Department of Psychiatry, Trinity Centre for Health Sciences, St. James's Hospital, Dublin, Ireland

⁹ADHD Unit, Geha Mental Health Centre, Petach-Tiqva, Israel

¹⁰Department of Developmental and Educational Psychology, University of Valencia, Valencia, Spain

¹¹Neuropediatrics Unit, La Fé University Hospital, Valencia, Spain

¹²University Clinic for Child and Adolescent Psychiatry, Essen, Germany

¹³Department of Experimental Clinical and Health Psychology, Ghent University, Ghent, Belgium

¹⁴Child and Adolescent Psychiatry, University of Göttingen, Göttingen, Germany

¹⁵Department of Clinical Neuropsychology, Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands

¹⁶Institute for Disorder on Impulse and Attention, School of Psychology, University of Southampton, Southampton, United Kingdom, UK

¹⁷Department of Child and Adolescent Psychiatry, University of Zurich, Zurich, Switzerland

¹⁸Clinical Psychology and Epidemiology, Institute of Psychology, University of Basel, Basel, Switzerland

Conflicts of interest: Consultancy fees were received by PA, TB, and AR from Shire, Lilly, Novartis, and Medice; and TB from Bristol Myers-Squibb, Develco Pharma and Vifor Pharma; and PA and TB from Janssen. Speaker/travel fees were paid to PA and TB from Shire, Lilly, Novartis, Janssen, and Medice; and AR from shire. PA held educational or research grants from Janssen, Shire, Vifor and QBTech; and AR from Shire. The present work is unrelated to the above grants and relationships. No other conflicts of interest are noted.

Grant sponsor: National Institutes of Health; Grant numbers: R01MH62873, R01MH081803; Grant sponsor: UK Medical Research Council; Grant number: G03001896; Grant sponsor: CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil.

*Correspondence to:

Nina Roth Mota, M.Sc., Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail address: ninarothmota@gmail.com

**Correspondence to:

Prof. Philip Asherson, MRC Social Genetic and Developmental Psychiatry, Institute of Psychiatry, Kings College London, London SE 58AF, UK.

E-mail address: philip.asherson@kcl.ac.uk

Article first published online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com): 2 July 2013

DOI 10.1002/ajmg.b.32179

¹⁹Research Unit for Child and Adolescent Psychiatry, Psychiatric Hospital, Aalborg University Hospital, Aalborg, Denmark

²⁰Department of Neuroscience, SUNY Upstate Medical University, Syracuse, New York

²⁴Department of Psychiatry, SUNY Upstate Medical University, Syracuse, New York

Manuscript Received: 25 January 2013; Manuscript Accepted: 30 May 2013

In a recent article we reported the association of alcohol dependence with interacting genotypes of the dopamine D2 (*DRD2*) and D4 (*DRD4*) receptor genes [Mota et al., 2013]. The interaction between the two dopamine receptor genes is thought to reflect different *DRD2-DRD4* heteromerization patterns, previously shown by experimental studies [Borrito-Escuela et al., 2011; González et al., 2012]. The present study extends the investigation of the *DRD2-DRD4* interaction to behavioral phenotypes during childhood and adolescence known to contribute to the development of drug and alcohol dependence in adulthood.

Childhood attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) predicts a higher prevalence of substance use disorder (SUD) in adulthood [Charach et al., 2011] and comorbid conduct disorder (CD) plays a mediating role in the association of ADHD with both SUD in general [Brook et al., 2010] and alcohol dependence specifically [Tuithof et al., 2012]. It is therefore possible that the reported *DRD2-DRD4* association with adult alcohol dependence could be mediated by CD, suggesting a developmental role for the *DRD2-DRD4* interaction effect on early behavioral precursors of alcohol dependence.

To investigate this hypothesis we used a subset of the International Multicenter ADHD Genetics (IMAGE) project, for whom the same *DRD2* and *DRD4* polymorphisms (rs2283265 and 48bp-VNTR, respectively) that had been used in the previous report were available [Mota et al., 2013]. The sample comprised 559 unrelated children and adolescents with a research diagnosis of DSM-IV combined subtype ADHD, of which 142 had comorbid CD; with a mean age of 10.86 years (SD = 2.692, range 7–17). Details of the sample, ascertainment, diagnostic procedures and genotyping have been reported previously [Brookes et al., 2006].

The *DRD2* and *DRD4* polymorphisms investigated in the present study are both thought to have functional effects and to interact with each other. In brief, the expression ratio of the short-(D_{2S}) and long-(D_{2L}) *DRD2* isoforms (mainly presynaptic and postsynaptic, respectively) are affected by the *DRD2* rs2283265 SNP, where the minor allele (T) favours the expression of the D_{2L} form. This allele has been associated with cocaine abuse [Moyer et al., 2011] and reduced working memory and attention control performances [Zhang et al., 2007]. For the *DRD4* 48-bp variable number tandem repeat (VNTR) polymorphism in exon 3, the most common variants are the 2-, 4- and 7-repeat alleles (2R, 4R, and 7R, respectively), with 7R being implicated in ADHD [Li et al., 2006].

Subjects were classified according to the presence of the *DRD2* and *DRD4* risk alleles (T and 7R, respectively) and, as in the previous study, subjects with rare *DRD4* alleles (not 2R, 4R, or 7R) were excluded from all analyses; all *P*-values are two-tailed. Chi-squared tests were first used to test the association of each SNP separately with CD. The presence of the T allele of the *DRD2* rs2283265 SNP

How to Cite this Article:

Mota NR, Bau CHD, Banaschewski T, Buitelaar JK, Ebstein RP, Franke B, Gill M, Kuntsi J, Manor I, Miranda A, Mulas F, Oades RD, Roeyers H, Rothenberger A, Sergeant JA, Sonuga-Barke EJ, Steinhausen HC, Faraone SV, Asherson P. 2013. Association Between *DRD2/DRD4* Interaction and Conduct Disorder: A Potential Developmental Pathway to Alcohol Dependence. *Am J Med Genet Part B* 162B:546–549.

was associated with higher prevalence of CD ($X^2 = 6.628$, $P = 0.01$), but there was no effect of the *DRD4* 7R allele ($X^2 = 0.073$, $P = 0.79$). Logistic regression revealed a significant *DRD2-DRD4* interaction ($P = 0.041$) associated with CD (Table Ia). Estimation of the odds ratio (OR) in the presence of interaction was performed as previously described [Mota et al., 2013].

The findings indicated that the presence of the *DRD2* T allele conferred an increased risk of CD (OR_{CI,95} = 2.33 (1.41–3.86)) for subjects that did not have the *DRD4* 7R allele, whereas there was no risk associated with the *DRD2* T allele for *DRD4* 7R carriers (OR_{CI,95} = 0.96 (0.48–1.91)) (Table Ib). This *DRD2-DRD4* interaction pattern is similar to the previously reported association with alcohol dependence in adults with and without ADHD [Mota et al., 2013]. In the earlier study, the concomitant presence of both *DRD2* T and *DRD4* 7R alleles was associated with a protective effect, compared to the presence of either one of them alone (i.e., in the absence of the other). Although in the present study no significant protective effect by the presence of both alleles was observed, the current results are in line with the previous study as they suggest that the significantly increased risk conferred by the *DRD2* T allele is suppressed by the concomitant presence of the *DRD4* 7R risk allele.

It has been shown that *DRD2* and *DRD4* receptors can be co-localized in the prefrontal cortex and striatal regions, where they may be pre- and postsynaptically located [Svingos et al., 2000; Rivera et al., 2002; De Mei et al., 2009; De Almeida Mengod, 2010]. Experimental studies on *DRD2-DRD4* heteromerization show that the D_{2L} variant is able to heteromerize with the three main *DRD4* variants, although less effectively with the *DRD4* 7R [Borrito-Escuela et al., 2011]. These authors suggest an enhancing

TABLE I. Interaction Effects Between *DRD4* 48bp VNTR and *DRD2* rs2283265 Polymorphisms in Conduct Disorder

	B	SE	Wald	df	OR (95% CI)	P-value
(a) Logistic regression model						
Main effects						
rs2283265 (T+ vs. GG)	0.526	0.205	6.555	1	1.692 [1.13–2.53]	0.010
<i>DRD4</i> 7R (<i>DRD4</i> 7R+ vs. 7R–)	–0.054	0.201	0.073	1	0.947 [0.64–1.41]	0.787
Interaction						
rs2283265 ^a <i>DRD4</i> 7R	–0.889	0.436	4.163	1	0.411 [0.18–0.97]	0.041
(b) Odds ratio estimation ^a						
rs2283265 (T+ vs. GG) in <i>DRD4</i> 7R+					0.96 [0.48–1.91]	0.902
rs2283265 (T+ vs. GG) in <i>DRD4</i> 7R–					2.33 [1.41–3.86]	0.001

^aOdds ratio estimation and corresponding confidence intervals [95% CI] for the presence of *DRD2* rs2283265 T allele (T+ vs. GG) in *DRD4* 7R carriers (*DRD4* 7R+) and non-carriers (*DRD4* 7R–).

allosteric receptor–receptor interaction exists with the D_{2L}-DRD4 2R and 4R heteromers, but not between D_{2L} and DRD4 7R and that these different processes may play a role in the forebrain. Meanwhile, the D_{2S} isoform is able to form heteromers only with DRD4 2R and 4R receptor types, but not with the DRD4 7R variant [González et al., 2012]. Based on in vivo and in vitro results, the authors strongly suggest that these D_{2S}-DRD4 heteromers may have a key role in dopamine-mediated modulation of striatal glutamate release.

Although the present study does not test heteromerization patterns directly, it is possible that our results may be reflecting the expected different DRD2–DRD4 heteromerization outcomes according to the concomitant presence (or absence) of the DRD4 7R, which is not able to heteromerize (or does it less efficiently) with D_{2S} and D_{2L} isoforms [Borroto-Escuela et al., 2011; González et al., 2012]. Further interpretation of these results requires additional studies to clarify how the different DRD2–DRD4 heteromerization processes modulate dopaminergic and/or glutamatergic neurotransmission and whether any such functional changes explain the *DRD2*–*DRD4* genetic associations reported in these studies.

A limitation of our study is the reliance on the candidate gene approach and the use of an interaction term, increasing the chances of a type I error. However within this context there is no substitute for replication and it is therefore of some interest that we see similar genetic effects on related externalizing phenotypes. Our previous study [Mota et al., 2013] implicated a significant *DRD2*–*DRD4* interaction effect in alcohol dependence in two independent samples. In the present study we were able to demonstrate that such interaction is also associated with CD in a sample of children/adolescents with ADHD. Despite the above stated limitations and differences between the two studies, the findings of the *DRD2*–*DRD4* interaction association with childhood/adolescent CD, a frequent precursor of later SUD, suggest a potential mechanism for one possible causal pathway that links childhood CD to the later development of alcohol dependence.

In summary, this is the third independent sample where disorders related to externalizing behavior are found to be associated

with a *DRD2*–*DRD4* interaction term. While these results look highly promising, further replication is still required to clarify the role of the *DRD2*–*DRD4* interaction on the course and outcome of childhood behavioral disorders on adult alcohol dependence, and to establish the processes involved throughout development.

ACKNOWLEDGMENTS

The IMAGE project was supported in part by National Institutes of Health (NIH) grants R01MH62873 and R01MH081803 to S.V.F. and, in London, by a UK Medical Research Council grant G03001896 to J.K. This work was also supported by a fellowship from CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil.

REFERENCES

- Borroto-Escuela DO, Van Craenenbroeck K, Romero-Fernandez W, Guidolin D, Woods AS, Rivera A, Haegeman G, Agnati LF, Tarakanov AO, Fuxe K. 2011. Dopamine D2 and D4 receptor heteromerization and its allosteric receptor–receptor interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 404: 928–934.
- Brook DW, Brook JS, Zhang C, Koppel J. 2010. Association between attention-deficit/hyperactivity disorder in adolescence and substance use disorders in adulthood. *Arch Pediatr Adolesc Med* 164: 930–934.
- Brookes K, Xu X, Chen W, Zhou K, Neale B, Lowe N, Anney R, 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, Fleischman K, Fliers E, Howe-Forbes R, Goldfarb A, Heise A, Gabriëls I, Korn-Lubetzki I, Johansson L, 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, Barrett R, Craig I, Banaschewski T, Sonuga-Barke E, Eisenberg J, Kuntsi J, Manor I, McGuffin P, Miranda A, Oades RD, Plomin R, Roeyers H, Rothenberger A, Sergeant J, Steinhausen H-C, Taylor E, Thompson M, Faraone SV, Asherson P. 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: 934–953.
- Charach A, Yeung E, Climans T, Lillie E. 2011. Childhood attention-deficit/hyperactivity disorder and future substance use disorders: Comparative meta-analyses. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 50: 9–21.

- De Almeida J, Mengod G. 2010. D2 and D4 dopamine receptor mRNA distribution in pyramidal neurons and GABAergic subpopulations in monkey prefrontal cortex: Implications for schizophrenia treatment. *Neuroscience* 170: 1133–1139.
- De Mei C, Ramos M, Iitaka C, Borrelli E. 2009. Getting specialized: Presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *Curr Opin Pharmacol* 9: 53–58.
- González S, Rangel-Barajas C, Peper M, Lorenzo R, Moreno E, Ciruela F, Borycz J, Ortiz J, Lluís C, Franco R, McCormick PJ, Volkow ND, Rubinstein M, Floran B, Ferré S. 2012. Dopamine D4 receptor, but not the ADHD-associated D4.7 variant, forms functional heteromers with the dopamine D2S receptor in the brain. *Mol Psychiatry* 17: 650–662.
- Li D, Sham PC, Owen MJ, He L. 2006. Meta-analysis shows significant association between dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Hum Mol Genet* 15: 2276–2284.
- Mota NR, Rovaris DL, Bertuzzi GP, Contini V, Vitola ES, Grevet EH, Roman T, Callegari-Jacques SM, Hutz MH, Bau CHD. 2013. DRD2/DRD4 heteromerization may influence genetic susceptibility to alcohol dependence. *Mol Psychiatry* 18: 401–402.
- Moyer RA, Wang D, Papp AC, Smith RM, Duque L, Mash DC, Sadee W. 2011. Intronic polymorphisms affecting alternative splicing of human dopamine D2 receptor are associated with cocaine abuse. *Neuropsychopharmacology* 36: 753–762.
- Rivera A, Cuéllar B, Girón FJ, Grandy DK, de la Calle A, Moratalla R. 2002. Dopamine D4 receptors are heterogeneously distributed in the striosomes/matrix compartments of the striatum. *J Neurochem* 80: 219–229.
- Svingos AL, Periasamy S, Pickel VM. 2000. Presynaptic dopamine D(4) receptor localization in the rat nucleus accumbens shell. *Synapse* 36: 222–232.
- Tuithof M, ten Have M, van den Brink W, Vollebbergh W, de Graaf R. 2012. The role of conduct disorder in the association between ADHD and alcohol use (disorder). Results from the Netherlands Mental Health Survey and Incidence Study 2. *Drug Alcohol Depend* 123: 115–121.
- Zhang Y, Bertolino A, Fazio L, Blasi G, Rampino A, Romano R, Lee M-LT, Xiao T, Papp A, Wang D, Sadee W. 2007. Polymorphisms in human dopamine D2 receptor gene affect gene expression, splicing, and neuronal activity during working memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 20552–20557.

5

Capítulo 5

LINKING DOPAMINE NEUROTRANSMISSION AND NEUROGENESIS: THE EVOLUTIONARY HISTORY OF THE NTAD (*NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2*) GENE CLUSTER

Genetics and Molecular Biology (2012) 35: 912-918

doi:10.1590 /S1415-47572012000600004



Linking dopamine neurotransmission and neurogenesis: The evolutionary history of the NTAD (*NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2*) gene cluster

Nina Roth Mota*, Eli Vieira Araujo-Jnr*, Vanessa Rodrigues Paixão-Côrtes, Maria Cátira Bortolini and Claiton Henrique Dotto Bau

Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Abstract

Genetic studies have long suggested the important role of the *DRD2* gene in psychiatric disorders and behavior. Further research has shown a conjoined effect of genes in the Chr11q22-23 region, which includes the *NCAM1*, *TTC12*, *ANKK1* and *DRD2* genes, or NTAD cluster. Despite a growing need to unravel the role of this cluster, few studies have taken into account interspecies and evolutionary approaches. This study shows that behaviorally relevant SNPs from the NTAD cluster, such as rs1800497 (Taq1A) and rs6277, are ancient polymorphisms that date back to the common ancestor between modern humans and Neanderthals/Denisovans. Conserved synteny and neighborhood indicate the NTAD cluster seems to have been established at least 400 million years ago, when the first Sarcopterygians emerged. The NTAD genes are apparently co-regulated and this could be attributed to adaptive functional properties, including those that emerged when the central nervous system became more complex. Finally, our findings indicate that NTAD genes, which are related to neurogenesis and dopaminergic neurotransmission, should be approached as a unit in behavioral and psychiatric genetic studies.

Keywords: NTAD cluster, Taq1A SNP, shared synteny, co-regulation, psychiatric genetics.

Introduction

The role of the NTAD cluster in psychiatric disorders

The crucial role played by dopaminergic neurotransmission systems in psychiatric genetics has been of great interest for several years. Among the candidate genes, one of the main focuses of research has been the dopamine receptor D2 (*DRD2*), especially its neighboring single-nucleotide polymorphism (SNP) rs1800497 (Taq1A). The rs1800497 SNP was considered to be a silent mutation located about 10 kb from *DRD2*, in the 3' untranslated region of this gene. The identification of a novel gene in the neighboring forward-strand region of *DRD2*, named *ANKK1*, showed that the rs1800497 SNP is actually located in exon 8 of *ANKK1* (Neville *et al.*, 2004), where it causes an amino acid change (Glu713Lys) in its 11th ankyrin repeat. Although the rs1800497 polymorphism is localized in *ANKK1*, it seems to be in linkage disequilibrium with several *DRD2* variants (Gelernter *et al.*, 2006; Dubertret *et al.*, 2010).

Despite the enormous number of studies regarding the role of the rs1800497 SNP in psychiatric disorders (es-

pecially alcohol and nicotine dependence), it is still far from clear how and to what degree it affects psychiatric disorders. The three most recent meta-analyses support the link between the rs1800497 T allele and alcoholism (Munafò *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2008; Le Foll *et al.*, 2009). There are two meta-analysis studies focusing on the relationship between rs1800497 and smoking behavior, but with conflicting results (Li *et al.*, 2004; Munafò *et al.*, 2004). Strong heterogeneity has been a hallmark of several of these meta-analyses. Consequently, the strong divergence among such findings raises the need to identify the variables that might explain such heterogeneity.

It has been suggested that two other nearby genes, *NCAM1* and *TTC12*, are also good candidate genes for psychiatric disorders and could comprise causative variants to phenotypes previously attributed to *DRD2* polymorphisms (Gelernter *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008; Dubertret *et al.*, 2010). For example, Yang *et al.* (2007) found an association of SNPs in the *NCAM1*, *TTC12* and *ANKK1* genes with alcohol dependence, but not so for SNPs in the *DRD2* gene. In another study, a single haplotype spanning *TTC12* and *ANKK1*, as well as multiple SNPs in these two genes, were associated with nicotine dependence (Gelernter *et al.*, 2006).

These genes are located on chromosome 11 (more precisely, the 11q22-23 region) and form a 521 kb gene

Send correspondence Claiton H.D. Bau. Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: claiton.bau@ufrgs.br.
*These authors contributed equally to the present study.

cluster that comprises the *NCAMI*, *TTC12*, *ANKKI* and *DRD2* genes, known as the NTAD gene cluster (Figure S1). The four genes that comprise the NTAD cluster all seem to act on the brain, although details of their specific functions in neural tissue have yet to be discovered. The neural cell adhesion molecule 1 (*NCAMI*) plays an important role in neurogenesis, specifically in axon and dendrite growth (McIntyre *et al.*, 2010). *TTC12* encodes the poorly understood tetratricopeptide repeat domain 12 protein, which seems to be involved in dopaminergic transmission and neurodevelopment via the Wnt signaling pathway (Kahto and Kahto, 2003; Castelo-Branco and Arenas, 2006). The ankyrin repeat and kinase domain containing 1 (*ANKKI*) gene encodes a signaling protein which takes part in indirect modulation of the expression of *DRD2* (Huang *et al.*, 2008), thus constituting the clearest currently known evidence of co-regulation in the NTAD cluster.

Gene cluster and genomic architecture: Evolutionary aspects

Gene order in eukaryotes cannot be attributed in its entirety to mere randomness. Multiple lines of evidence indicate that co-expressed, co-regulated and co-functional genes can be maintained as a gene cluster due to the pressure of natural selection (Hurst *et al.*, 2004; Sémon and Duret, 2006; Michalak, 2008).

Considering that polymorphisms of the NTAD gene cluster seem to have a conjoined effect, the question raised is how long these genes are being maintained with shared synteny (genes in the same chromosome) and conserved neighborhood (genes side-by-side in the same order) through the course of evolution. If the NTAD conformation is recent or human-specific it may reflect an adaptive novelty or stochastic clustering in *Homo/Homo sapiens*. Notwithstanding, the maintenance of a specific gene cluster such as NTAD over long evolutionary periods is much more difficult to be explained by actions of random processes only. An ancient clustering in this case might also reflect a functional benefit and/or an orchestrated evolution of genes involved in neurotransmission and neurogenesis, probably mediated by co-regulation, co-expression or molecular co-functionality.

Hominid comparative genomics has made great strides after the publication of the Neanderthal and Denisovan nuclear genomes since it has allowed researchers to build on knowledge about unique human phenotypes, including psychiatric disorder susceptibilities in present-day populations. Some of these psychiatric disorders have been repeatedly associated with variation in the whole NTAD cluster, but no previous study investigated it from a wider evolutionary perspective using comparative genomic approaches. Taking this information into account we herein performed the first *in silico* study addressing the genomic architecture and chromosomal dynamics of the NTAD cluster from an evolutionary perspective. Our results pro-

vide a more comprehensive view about this gene cluster and how its dynamics could shape future genetic studies of complex behavior phenotypes and psychiatric disorder in humans.

Material and Methods

Analysis of NTAD SNP status in primates

Seven human SNPs were chosen based on previous association with psychiatric disorders and/or with evidence of functionality: rs646558 from *NCAMI*; rs723077 and rs2303380 from *TTC12*; rs2734849 and rs1800497 from *ANKKI*; and rs6277 and rs2283265 from *DRD2* (Figure S1). These polymorphic sites were then compared with their counterparts in the genomes of two archaic hominids, *Homo neanderthalensis* (Green *et al.*, 2010) and a Denisovan specimen (Reich *et al.*, 2010), as well as nine non-human primates. The derived allele age was estimated for the rs1800497 and rs6277 SNPs according to the frequency based method, as proposed by Slatkin and Rannala (2000).

Three different approaches were used to predict whether the three non-synonymous mutations (rs1800497 and rs2734849 in *ANKKI*; rs723077 in *TTC12*) among the seven SNPs promote important functional changes in the proteins: PolyPhen2, SNAP and the assessment of Grantham scores of chemical distance (Grantham, 1974). For the latter we used the classification by Li *et al.* (1985) as: conservative (Grantham score = 0-50), moderately conservative (51-100), moderately radical (101-150) and radical (> 151). These methods are used to predict the possible impact of amino acid substitutions on the structure and function of proteins by means of chemico-physical and comparative evidence.

Orthology, synteny and neighborhood status of the NTAD cluster in vertebrate genomes

The online databases Ensembl release 66, UCSC Genome Browser and UniProt were used as sources for the nucleotide and protein sequences of *NCAMI*, *TTC12*, *ANKKI* and *DRD2* genes in the human genome and their orthologues in 47 other vertebrate species (Table S1). Their synteny and neighborhood status were inferred from the available contigs. BLAST/BLAT searches in these databases were performed to find possible unannotated orthologues. BioEdit version 7.0.9.0 (Hall, 1999) was used to align the sequences of the orthologues, when necessary. The ENCODE database was used to infer transcription factor binding sites in the NTAD cluster. ENCODE is based on text mining applications by SABiosciences and gene annotations of regulatory binding sites available at the UCSC Genome Browser.

Results and Discussion

Comparative analyses of seven SNPs belonging to the NTAD gene cluster in human and non-human primates

Our analyses based on the seven SNPs selected according to their association with psychiatric disorders and/or with evidence of functionality, revealed interesting results (Table 1). For instance, we were able to show that polymorphisms believed to be *H. sapiens*-specific turned out to be plausibly widespread in the *Homo* genus. Although the introgression of *H. sapiens* derived alleles to other hominids could not be disregarded, these polymorphisms could be traced back to at least 270,000-800,000 years when our lineage diverged from Neanderthals/Denisovans (Green *et al.*, 2010; Reich *et al.*, 2010). This seems to be the case for the rs1800497 SNP, where both ancestral and derived alleles (taking into account that a mutation event produces a new, mutant or derived allele, that is different from the “original” or ancestral one) are present in the Denisovan genome, while in Neanderthals only the derived allele could be found, denoting that the A → G (Glu713Lys) mutation occurred before the origin of *Homo sapiens*. Our estimate for the age of the derived allele (Slatkin and Rannala, 2000) is compatible with this hypothesis (379,000-447,000 years).

A similar situation was detected with the *DRD2* rs6277 SNP, but in this case both alleles were found in Neanderthals (Table 1). Interestingly, the estimation of allele age for the derived allele of this polymorphism presented a greater discrepancy among populations. For Africans and Asians it was about 65,000 years, whereas for Europeans it was set at 359,000 years. These results raised some instigating hypotheses, including allele introgression from Neanderthals to *H. sapiens* in European populations, with subsequent dispersion to other continents. Selection processes and genetic drift, inflating the derived allele frequency in Europe, are other possible explanations. It seems however unlikely that stochastic processes would keep these polymorphisms unchanged for such a long time. Signals of positive selection were found in variant alleles of a related dopaminergic gene (*DRD4*) associated with modern psychiatric disorders. Some of these variants are associated with behavioral traits that could have had some adaptive advantage in the past, but today may have clinical implications (Ding *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004; Tovo-Rodrigues *et al.*, 2011). A similar scenario may be responsible for the maintenance of these polymorphic sites in the human lineage, although only further studies can test this hypothesis.

On the other hand, the *TTC12* rs2303380 and *DRD2* rs2283265 SNPs are likely to be *Homo sapiens*-specific. The *NCAM1* rs646558 derived allele (C) is also *H. sapiens*-specific, but curiously its ancestral allele (A) is exclusively found in Old World primates, while a third allele (G) is found in lemurs and New World monkeys (Table 1). This

Table 1 - Single nucleotide variation in the NTAD cluster across primate genomes.

Gene	Position	SNP	Old World Primate						New World Primate			Lemurs					
			Human			Denisova	Neandertal	Chimp	Gorilla	Orangutan	Baboon	Rhesus	Marmoset	Tarsier	Mouse lemur	Bushbaby	
			AFA	M.A.F	ASN	M.A.F	EUR	M.A.F									
<i>NCAM1</i>	Intron 13	rs646558	A/C	0,575 (A)	0,196 (A)	0,252 (A)	A	A	A	A	A	A	A	A	G	G	G
<i>TTC12</i>	Exon 3	rs723077*	A/C	0,097 (C)	0,308 (C)	0,487 (C)	A	?	A	A	A	A	A	A	G	G	A
<i>TTC12</i>	Intron 7	rs2303380	A/G	0,338 (G)	0,39 (G)	0,381 (G)	A	?	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>ANKK1</i>	Exon 8	rs2734849*	A/G	0,115 (G)	0,024 (G)	0,473 (G)	A	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A
<i>ANKK1</i>	Exon 8	rs1800497* (TaqIA)	A/G	0,411 (A)	0,407 (A)	0,195 (A)	A/G	G	A	A	A	A	A	A	=	A	A
<i>DRD2</i>	Exon 7	rs6277	G/A	0,034 (A)	0,049 (A)	0,534 (A)	G	G/A	G	G	A	A	A	A	A	A	G
<i>DRD2</i>	Intron 5	rs2283265	C/A	0,092 (A)	0,422 (A)	0,167 (A)	C	?	C	C	C	C	C	C	C	?	C

*Non-synonymous polymorphism. M.A.F = Minor Allele Frequency, indicated in parenthesis, obtained in HAPMAP. Mean frequencies were computed using European (CEU), Asian (CHB and JPT) and African (YRI) populations. Genomes included: Human (*Homo sapiens*), Denisova (Denisova cave specimen), Neandertal (*Homo neanderthalensis*), Chimpanzee (*Pan troglodytes*), Gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*), Orangutan (*Pongo pygmaeus abelii*), Baboon (*Papio hamadryas*), Rhesus (*Macaca mulatta*), Marmoset (*Callithrix jacchus*), Tarsier (*Tarsier syrichta*), Mouse lemur (*Microcebus murinus*) and Bushbaby (*Otolemur garnettii*). (=): aligning species have one or more unalignable bases in the gap region. (?): No information available.

denotes that the G → A mutation possibly occurred on the phylogenetic branch leading to the Old World primates.

The additional analysis of the three non-synonymous SNPs rendered only the Met73Leu (rs723077) mutation in the *TTC12* gene as a non-neutral amino acid change, which the SNAP prediction tool indicated that the protein's chemico-physical properties may change in response to this substitution. The failure in detecting similar results for the other two mutations does not necessarily imply that they have no functional impact since the SNAP, PolyPhen2 and Grantham Score programs were designed to indicate only significant chemical changes in protein structure. Likewise, detecting a non-neutral signal does not necessarily imply direct association with relevant phenotypic changes.

Orthology, synteny and neighborhood status of the NTAD cluster in vertebrate genomes

Our comparative analysis involved human NTAD gene sequences as query for BLAST searches in the other 46 available vertebrate genome sequences (Table S1). Most of the orthologous genes were previously annotated in the databases used. Additionally, we were able to identify some new *ANKK1* orthologues. This included an unannotated ~1.5kb long *ANKK1* ortholog sequence in the porcine (*Sus scrofa*) genome (Table S1), comprising three exons (orthologous to the human exons 3, 4 and 5; 76% identity), from which a 119 amino acid-long protein sequence could be predicted (86% identity). This *ANKK1* orthologue in pigs is located downstream from *DRD2*, changing the gene order in the cluster from NTAD to NTDA (*NCAMI-TTC12-DRD2-ANKK1*). This interesting result illustrates a unique chromosomal inversion in the porcine lineage (Figure 1). Two other probable new *ANKK1* orthologues were identified in the alpaca (*Vicugna pacos*) and rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) genomes (Table S1), but in both cases the expected NTAD gene order was retained.

Conserved synteny and neighborhood of the whole NTAD cluster was observed in 22 of the 48 vertebrate species studied (46%), other 4 species present conserved synteny but do not share full neighborhood (Teleostei: *Danio rerio*, *Gasterosteus aculeatus*, *Tetraodon nigroviridis*; Artiodactyla: *Sus scrofa*; Figure 1). The synteny and neighborhood status of the NTAD cluster in the other genomes could not be ascertained due to low coverage and/or incomplete assembly.

One of the main features of the NTAD cluster (Figure S1) is that *DRD2* is located in the reverse strand (or minus strand) in relation to the other three genes in all vertebrate genomes, except in the porcine genome due to the inversion described above. The presence of more than one *NCAMI* and *DRD2* orthologue copies in teleost fishes (Figure 1B, Table S1) is in agreement with the known genome duplication in this taxon (Jaillon *et al.*, 2009). However, we did not observe conserved synteny in all copies of *NCAMI* and *DRD2*, since the extant copies not included in

the NTAD cluster are located in different chromosomes (Table S1). This raises the question of possible subfunctionalization or neofunctionalization of these gene copies.

It is worthy of note that NTAD cluster synteny is conserved in teleost fishes, but not the neighborhood of its genes. About three million bases, containing ~100 genes, separate *NCAMI* from the TAD cluster (*TTC12-ANKK1-DRD2*), which can be tracked back to at least ~525 Mya in the origin of vertebrates. The *NCAMI* neighborhood was apparently gained when the Sarcopterygians emerged ~400 Mya and seems to have been maintained since then (Figure 1C).

Although phenomena such as tandem duplications, inversions, rearrangements and indels may account for non-random patterns of the genome (Hurst *et al.*, 2004), none of these explain by themselves the origin and conservation of the NTAD cluster. Thus other hypotheses need to be considered.

Several authors have demonstrated that clustered genes are kept together for a long period of time to preserve intact their co-regulatory system and consequently phenotype integrity. For instance, several *cis*-regulatory sequences are preserved throughout all vertebrate genomes due to their role in development (Kikuta *et al.*, 2007). One interesting fact about the NTAD gene cluster is that a polymorphism in one gene might indirectly affect the expression levels of a neighboring gene. Huang *et al.* (2008) demonstrated that the *ANKK1* rs2734849 SNP alters the expression level of NF-κB-regulated genes and, since *DRD2* gene expression is regulated by the transcription factor NF-κB (Fiorentini *et al.*, 2002; Bontempi *et al.*, 2007), it might be indirectly regulated by *ANKK1*. The search for regulatory transcription factors in the ENCODE database showed that the *NCAMI* gene also seems to be regulated by NF-κB, as well as *TTC12* paralogues (Table S2), denoting a possible role of this transcription factor in the co-regulation of the NTAD genes.

Based on computer simulations, Yerushalmi and Teicher (2007) showed an extraordinary tendency for essential genes to cluster as a result of natural selection pressures. Our results illustrate, for the first time to our knowledge, such a tendency for genes with essential functions in neurogenesis and dopaminergic neurotransmission. Thus, it is likely that natural selection, through the formation of the NTAD cluster, has played a role in the emergence of an efficient mechanism of co-regulation, when the vertebrate central nervous system acquired novel traits and gained complexity. Equally important must have been the role of natural selection in maintaining the NTAD cluster practically intact for at least 400 million years.

Notwithstanding, certain limitations must be considered when interpreting the results of the present study. Several assumptions presented here rely on available genomic data and analyses that are still preliminary. This is especially true for tests considering alternative explanations for

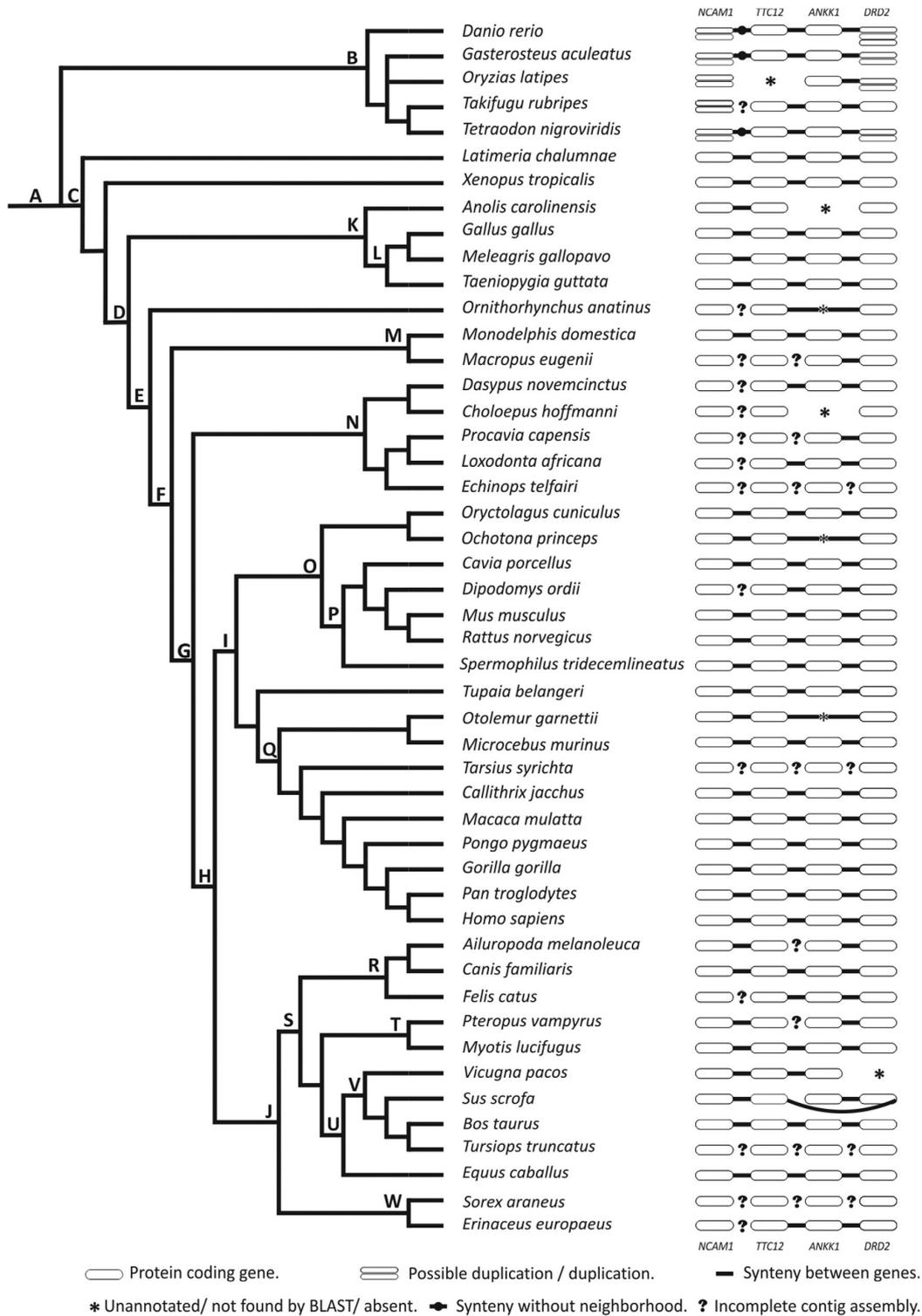


Figure 1 - Conservation of synteny and neighborhood in the NTAD cluster across 48 vertebrate genomes. The tree was compiled based on Agnarsson *et al.* 2010, Asher and Helgen 2010, Horner *et al.* 2007, Janes *et al.* 2010, Page and Goodman 2001, Pacheco *et al.* 2011. A: Vertebrata; B: Teleostei; C: Sarcopterygii; D: Amniota; E: Mammalia; F: Theria; G: Eutheria; H: Boreoeutheria; I: Euarchontoglires; J: Laurasiatheria; K: Sauria; L: Aves; M: Marsupialia; N: Atlantogenata; O: Glires; P: Rodentia; Q: Primates; R: Carnivora; S: Scrotifera; T: Chiroptera; U: Euungulata; V: Artiodactyla; W: Lipotyphla.

specific SNPs that are widespread in the *Homo genus* and for the rate of maintained of four-gene clusters since or before the origin of vertebrates. We understand that a major goal of this study is to stimulate further research in the evolutionary history of gene clusters using the currently available genomic data and emerging bioinformatics tools.

Conclusion

Our results suggest that genes related to neurogenesis and dopaminergic neurotransmission may be interconnected in the course of the evolution of the complex vertebrate neural system via a common functional genomic architecture and chromosomal dynamics. Associated with due consideration of linkage disequilibrium patterns, this denotes the importance of approaching the NTAD cluster as a candidate functional unit, rather than its genes separately, in behavioral and psychiatric genetic studies.

Acknowledgments

We thank Brazilian funding agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX) for financial support.

References

- Agnarsson I, Kuntner M and May-Collado LJ (2010) Dogs, cats, and kin: A molecular species-level phylogeny of Carnivora. *Mol Phylogenet Evol* 54:726-745.
- Asher RJ and Helgen KM (2010) Nomenclature and placental mammal phylogeny. *BMC Evol Biol* 10:e102.
- Bontempi S, Fiorentini C, Busi C, Guerra N, Spano P and Missale C (2007) Identification and characterization of two nuclear factor-kappaB sites in the regulatory region of the dopamine D2 receptor. *Endocrinology* 148:2563-2570.
- Castelo-Branco G and Arenas E (2006) Function of Wnts in dopaminergic neuron development. *Neurodegener Dis* 3:5-11.
- Ding YC, Chi HC, Grady DL, Morishima A, Kidd JR, Kidd KK, Flodman P, Spence MA, Schuck S, Swanson JM, *et al.* (2002) Evidence of positive selection acting at the human dopamine receptor D4 gene locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:309-314.
- Dubertret C, Bardel C, Ramoz N, Martin PM, Deybach JC, Adès J, Gorwood P and Gouya L (2010) A genetic schizophrenia-susceptibility region located between the *ANKK1* and *DRD2* genes. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34:492-499.
- Fiorentini C, Guerra N, Facchetti M, Finardi A, Tiberio L, Schiaffonati L, Spano P and Missale C (2002) Nerve growth factor regulates dopamine D(2) receptor expression in prolactinoma cell lines via p75(NGFR)-mediated activation of nuclear factor-kappaB. *Mol Endocrinol* 16:353-366.
- Gelernter J, Yu Y, Weiss R, Brady K, Panhuysen C, Yang BZ, Kranzler HR and Farrer L (2006) Haplotype spanning *TTC12* and *ANKK1*, flanked by the *DRD2* and *NCAMI* loci, is strongly associated to nicotine dependence in two distinct American populations. *Hum Mol Genet* 15:3498-3507.
- Grantham R (1974) Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* 185:862-864.
- Green RE, Krause J, Briggs AW, Maricic T, Stenzel U, Kircher M, Patterson N, Li H, Zhai W, Fritz MHY, *et al.* (2010) A draft sequence of the Neandertal genome. *Science* 328:710-722.
- Hall TA (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95-98.
- Horner DS, Lefkimmatis K, Reyes A, Gissi C, Saccone C and Pesole G (2007) Phylogenetic analyses of complete mitochondrial genome sequences suggest a basal divergence of the enigmatic rodent *Anomalurus*. *BMC Evol Biol* 7:e16.
- Huang W, Payne TJ, Ma JZ, Beuten J, Dupont RT, Inohara N and Li MD (2008) Significant association of *ANKK1* and detection of a functional polymorphism with nicotine dependence in an African-American sample. *Neuropsychopharmacology* 34:319-330.
- Hurst LD, Pál C and Lercher MJ (2004) The evolutionary dynamics of eukaryotic gene order. *Nat Rev Genet* 5:299-310.
- Jaillon O, Aury JM and Wincker P (2009) "Changing by doubling", the impact of Whole Genome Duplications in the evolution of eukaryotes. *C R Biol* 332:241-253.
- Janes DE, Organ CL, Fujita MK, Shedlock AM and Edwards SV (2010) Genome evolution in Reptilia, the sister group of mammals. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 11:239-264.
- Katoh M and Katoh M (2003) Identification and characterization of *TTPARM* gene *in silico*. *Int J Oncol* 23:1213-1217.
- Kikuta H, Laplante M, Navratilova P, Komisarczuk AZ, Engström PG, Fredman D, Akalin A, Caccamo M, Sealy I, Howe K, *et al.* (2007) Genomic regulatory blocks encompass multiple neighboring genes and maintain conserved synteny in vertebrates. *Genome Res* 17:545-555.
- Le Foll B, Gallo A, Le Strat Y, Lu L and Gorwood P (2009) Genetics of dopamine receptors and drug addiction: A comprehensive review. *Behav Pharmacol* 20:1-17.
- Li MD, Ma JZ and Beuten J (2004) Progress in searching for susceptibility loci and genes for smoking-related behavior. *Clin Genet* 66:382-392.
- Li WH, Wu CI and Luo CC (1985) A new method for estimating synonymous and nonsynonymous rates of nucleotide substitution considering the relative likelihood of nucleotide and codon changes. *Mol Biol Evol* 2:150-174.
- McIntyre JC, Titlow WB and McClintock TS (2010) Axon growth and guidance genes identify nascent, immature, and mature olfactory sensory neurons. *J Neurosci Res* 88:3243-3256.
- Michalak P (2008) Coexpression, coregulation, and cofunctionality of neighboring genes in eukaryotic genomes. *Genomics* 91:243-248.
- Munafò M, Clark T, Johnstone E, Murphy M and Walton R (2004) The genetic basis for smoking behavior: A systematic review and meta-analysis. *Nicotine Tob Res* 6:583-597.
- Munafò MR, Matheson IJ and Flint J (2007) Association of the *DRD2* gene Taq1A polymorphism and alcoholism: A meta-analysis of case-control studies and evidence of publication bias. *Mol Psychiatry* 12:454-461.
- Neville MJ, Johnstone EC and Walton RT (2004) Identification and characterization of *ANKK1*: A novel kinase gene closely

- linked to *DRD2* on chromosome band 11q23.1. *Hum Mutat* 23:540-545.
- Pacheco MA, Battistuzzi FU, Lentino M, Aguilar R, Kumar S and Escalante AA (2011) Evolution of modern birds revealed by mitogenomics: Timing the radiation and origin of major orders. *Mol Biol Evol* 28:1927-1942.
- Page SL and Goodman M (2001) Catarrhine phylogeny: Non-coding DNA evidence for a diphyletic origin of the mangabeys and for a human-chimpanzee clade. *Mol Phylogenet Evol* 18:14-25.
- Reich D, Green RE, Kircher M, Krause J, Patterson N, Durand EY, Viola B, Briggs AW, Stenzel U, Johnson PL, *et al.* (2011) Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia. *Nature* 468:1053-1060.
- Sémon M and Duret L (2006) Evolutionary origin and maintenance of coexpressed gene clusters in mammals. *Mol Biol Evol* 23:1715-1723.
- Slatkin M and Rannala B (2000) Estimating allele age. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 1:225-249.
- Smith L, Watson M, Gates S, Ball D and Foxcroft D (2008) Meta-analysis of the association of the Taq1A polymorphism with the risk of alcohol dependency: A HuGE gene-disease association review. *Am J Epidemiol* 167:125-138.
- Tovo-Rodrigues L, Rohde LA, Roman T, Schmitz M, Polanczyk G, Zeni C, Marques FZ, Contini V, Grevet EH, Belmonte-de-Abreu P, *et al.* (2011) Is there a role for rare variants in *DRD4* gene in the susceptibility for ADHD? Searching for an effect of allelic heterogeneity. *Mol Psychiatry* 17:520-526.
- Wang E, Ding YC, Flodman P, Kidd JR, Kidd KK, Grady DL, Ryder OA, Spence MA, Swanson JM and Moyzis RK (2004) The genetic architecture of selection at the human dopamine receptor D4 (*DRD4*) gene locus. *Am J Hum Genet* 74:931-944.
- Yang BZ, Kranzler HR, Zhao H, Gruen JR, Luo X and Gelernter J (2007) Association of haplotypic variants in *DRD2*, *ANKK1*, *TTC12* and *NCAM1* to alcohol dependence in independent case-control and family samples. *Hum Mol Genet* 16:2844-2853.
- Yerushalmi U and Teicher M (2007) Examining emergence of functional gene clustering in a simulated evolution. *Bull Math Biol* 69:2261-2280.

Internet Resources

- CisRED: Database of genome-wide regulatory module and element predictions, <http://www.cisred.org/> (June 20, 2011).
- DECODE: Decipherment of DNA Elements, <http://www.sabiosciences.com/chipqpcrsearch.php?app=T> FBS (July 4, 2011).
- Ensembl Genome Browser, <http://www.ensembl.org/index.html> (July 5, 2011).
- GeneCards v.3: the Human Genome Compendium, <http://www.genecards.org/> (May 17, 2011).
- UCSC Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu/> (July 10, 2011).
- UniProt Protein Database, <http://www.uniprot.org/> (April 5, 2011).
- PolyPhen2: Prediction of Functional Effects of Human nsSNPs, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/> (July 12, 2011).
- SNAP: Effects of Single Amino Acid Substitutions on Protein Function, <http://rostlab.org/services/snap/>, (July 12, 2011).

Supplementary Material

The following online material is available for this article:

- Table S1 - Orthologues of genes in the NTAD cluster in 48 available vertebrate genomes.
- Table S2 - Transcription factors predicted by DECODE as regulators of the NTAD genes in humans.
- Figure S1 - NTAD cluster in the human genome.

This material is available as part of the online article from <http://www.scielo.br/gmb>.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Table S1. Orthologues of genes in the NTAD cluster in 47 available vertebrate genomes, showing accession number and location.

Taxon	Genome	Coverage	NCAM1	TTC12	ANKK1	DRD2
TELEOSTEI	<i>Danio rerio</i> (Zebrafish)	~7.5X	ncam1a ENSIDARG00000056181 21:226157801-23024668:-1	ENSIDARG00000056896 15:209098817-20942192:1	ENSIDARG000000056921 15:20975671-20986596:1	drd2a ENSIDARG000000056926 15:21008646-21030749:-1
			ncam1b ENSIDARG00000007220 15:17312414-17518321:-1			drd2b ENSIDARG00000011091 5:59424412-59461143:-1
						drd2l ENSIDARG00000014858 16:57790203-57818030:1
TELEOSTEI	<i>Gasterosteus aculeatus</i> (Stickleback)	6X	1 of 2 ENSGACG00000020773 groupVII:24387904-24556179:-1	ENSGACG00000009165 groupI:85586681-8571918:-1	ENSGACG00000009159 groupI:8533757-8538878:-1	drd2 ENSGACG000000009131 groupI:8509579-8522810:1
			2 of 2 ENSGACG00000010697 groupII:1344908-14377049:-1			prediction ENSGACG00000012513 groupXX:4002115-14008728:1
TELEOSTEI	<i>Oryzias latipes</i> (Medaka)	10.6X	1 of 2 ENSORLIG000000014681 14:29382768-29464062:-1	absent	ENSORLIG00000007503 13:15062437-15069570:1	drd2 ENSORLIG000000007515 13:15093829-15118346:-1
			2 of 2 ENSORLIG00000005127 13:10809441-10820108:-1			prediction ENSORLIG00000015195 16:22630038-22544806:1
TELEOSTEI	<i>Takifugu rubripes</i> (Fugu)	8.5X	1 of 2 ENSTRUG00000002966 scaffold_454:55293-71171:-1	ENSTRUG000000014546 scaffold_9:1673315-1683905:1	ENSTRUG000000014611 scaffold_9:1700087-1707491:1	drd2 ENSTRUG000000014690 scaffold_9:1719056-1732814:-1
			2 of 2 ENSTRUG000000007164 scaffold_156:454454-475510:-1			

Table S1 (cont). Orthologues of genes in the NTAD cluster in 47 available vertebrate genomes, showing accession number and location.

Taxon	Genome	Coverage	NCAMI	TTC12	ANKK1	DRD2
TELEOSTEI	<i>Tetraodon nigroviridis</i> (Tetraodon)	7.9X	1 of 2 ENSTING000000003948 Un_random:27638663-27656333:1	ENSTING00000000136Z 16:938567-948048:-1	ENSTING00000000777B 16:921218-925980:-1	drcd2 ENSTING000000007779 16:901459-913203:1
			2 of 2 ENSTING00000001618B 16:3055810-3078332:1			prediction ENSTING00000000434Z Un_random:6941708-69447001:-1
COELACANTHIMORPHA	<i>Latimeria chalumnae</i>	~7X	ENSLACG000000018069 JHI.26571.1:2687432-2874385	ENSLACG000000018234 JHI.26571.1:29276015-2964315	ENSLACG000000018279 JHI.26571.1:2974006-2990122	ENSLACG000000018381 JHI.26571.1:3151137-3199198
			ENSLACG000000018069 Un_random:13273359-1333515:-1	ENSLACG000000018234 GL172954.1:1165658-11229867:-1	ENSLACG000000018279 GL172954.1:1081038-1104804:-1	ENSLACG000000018381 GL172954.1:3921005-3977728:1
ANURA	<i>Xenopus tropicalis</i>	7.65X	ENSXETG000000011665 GL172954.1:1273359-1333515:-1	ENSXETG000000011664 GL172954.1:1165658-11229867:-1	ENSXETG000000011663 GL172954.1:1081038-1104804:-1	ENSXETG000000011662 GL172954.1:3921005-3977728:1
			ENXSACG0000000828Z GL343354.1:608176-677439:-1	ENXSACG00000008658 GL343354.1:1563247-588419:-1	absent	ENXSACG00000008768 GL343354.1:4651491-460712:1
SAURIA	<i>Gallus gallus</i> (chicken)	6.6X	ENSGALG00000007899 24:5933204-6012150:-1	ENSGALG00000007893 24:5913010-5927569:-1	ENSGALG00000007815 24:5895790-5901363:-1	ENSGALG00000007794 24:5874347-5879422:1
					LOC415708 (possible ortholog) ENSGALG00000021325 11:2623206-2645774:1	
SAURIA	<i>Meleagris gallopavo</i> (Turkey)	1.7X	ENSMGAG000000004316 26:6151710-6193006:-1	ENSMGAG000000004280 26:6115795-6128289:-1	ENSMGAG000000004289 26:6094781-6100367:-1	ENSMGAG000000004223 26:6072432-6078559:1
			ENSTGLUG00000000275 24:1260906-1302411:-1	ENSTGLUG00000000270 24:1238535-1250741:-1	ANKK1 ENSTGLUG0000000026Z 24:1219793-1221928:-1	ENSTGLUG00000000255 24:1191855-1188991:1
SAURIA	<i>Taeniopygia guttata</i> (Zebra Finch)	6X			prediction ENSTGLUG0000000686Z 11:6734086-6737962:1	

Table S1 (cont). Orthologues of genes in the NTAD cluster in 47 available vertebrate genomes, showing accession number and location.

Taxon	Genome	Coverage	NCAM1	TTC12	ANKK1	DRD2
MONOTREMATA	Ornithorhynchus anatinus (Platypus)	6X	NCAM1 ENSGANG00000009247 Contig6246:2719-29891:1 Contig130353:10492-20417:1	ENSDAN600000010971 Contig6246:2719-29891:1	absent	ENSDANG000000010970 Contig6246:1327-6313:1
	<i>Monodelphis domestica</i> (Opossum)	6.8X	ENSMODG000000014314 41239164918-239249671:1	ENSMODG000000014228 41239070355-239121360:1	ENSMODG000000014205 41239028762-239049233:1	ENSMODG000000014196 41238978598-239009228:1
	<i>Macropus eugenii</i> (Wallaby)	2X	ENSMELUG000000012605 GeneScaffold_5807:10353-87553:1	ENSMELUG00000009795 GeneScaffold_5805:596-50221:1	ENSMELUG00000000701 GeneScaffold_5806:4947-18128:1	ENSMELUG00000000707 GeneScaffold_5806:34377-57516:1
XENARTHRA	<i>Dasyurus novemcinctus</i> (Armadillo)	2X	ENSDNCG00000009390 GeneScaffold_4191:71062-134109:1	ENSDNCG00000024773 GeneScaffold_4190:3979-86586:1	ENSDNCG000000013438 GeneScaffold_4190:113028-126154:1	ENSDNCG00000007008 GeneScaffold_4190:13817-150433:1
	<i>Choloepus hoffmanni</i> (Sloth)	2.05X	ENSCHOG00000002918 GeneScaffold_4607:4688-64724:1	ENSCHOG000000010881 GeneScaffold_4606:474-34240:1	absent	ENSCHOG00000008920 GeneScaffold_4606:898-13027:1
	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Rabbit)	7.48X	ENSOCUG00000006190 14103078226-103142725:1	ENSOCUG000000011625 14103004607-103049887:1	biatUCSC (85% id) chr1:102,979,282-102,990,588	ENSOCUG000000011657 14102961300-102971002:1
LAGOMORPHA	<i>Ochotona princeps</i> (Pika)	1.93X	ENSOPRG000000014977 GeneScaffold_2905:194352-257089:1	ENSOPRG000000015703 GeneScaffold_2905:281638-324574:1	absent	ENSOPRG000000015750 GeneScaffold_2905:247086-356689:1
	<i>Cavia porcellus</i> (Guinea pig)	6.79X	ENSPOG000000004681 scaffold_19:34540713-34601476:1	ENSPOG000000004685 scaffold_19:34455258-34511005:1	ENSPOG000000001170 scaffold_19:34420990-34430699:1	ENSPOG000000009265 scaffold_19:34388884-34411581:1
RODENTIA	<i>Dipodomys ordii</i> (Kangaroo rat)	1.85X	ENSODRG000000015038 scaffold_2068:5606-68849:1	ENSODRG000000013510 GeneScaffold_3885:3227-33111:1	ENSODRG000000013515 GeneScaffold_3885:49442-58538:1	ENSODRG000000013516 GeneScaffold_3885:66648-74803:1
	<i>Mus musculus</i> (Mouse)	high	ENSMJUG000000039542 949310257-49607027:1	ENSMJUG000000040219 949245068-49294330:1	ENSMJUG000000032257 949223337-49733126:1	ENSMJUG000000032259 949148732-49716282:1
	<i>Rattus norvegicus</i> (Rat)	~2X	ENSRNCG000000031890 852822361-52885028:1	ENSRNCG000000008995 852742796-52799135:1	ENSRNCG000000005037 852714245-52722913:1	ENSRNCG000000008428 852641169-52707746:1
	<i>Spermophilus tridecemlineatus</i> (Squirrel)	1.90X	ENSTOG000000003495 GeneScaffold_3272:15324-20948:1	ENSTOG000000003513 GeneScaffold_3272:98637-146451:1	ENSTOG000000003546 GeneScaffold_3272:160571-171799:1	ENSTOG000000003570 GeneScaffold_3272:79881-19778:1

Table S1 (cont). Orthologues of genes in the NTAD cluster in 47 available vertebrate genomes, showing accession number and location.

Taxon	Genome	Coverage	NCAM1	TTC12	ANKK1	DRD2
INSECTIVORA	<i>Sorex araneus</i> (Shrew)	1.9X	ENSSARG00000006760 scaffold_4137:32399-65702.1	ENSSARG00000003877 GeneScaffold_5578:4431-103273.1	ENSSARG000000001799 GeneScaffold_4138:3143-94291.1	ENSSARG000000001799 GeneScaffold_4138:3143-94291.1
	<i>Echinops telfairi</i> (Lesser hedgehog tenrec)	2X	ENSETEG000000010392 scaffold_319785:74303-79506.1	ENSETEG000000009125 GeneScaffold_4950:12296-130505.1	ENSETEG000000002513 GeneScaffold_6711:8112-56359.1	ENSETEG000000012787 scaffold_222770:3-9483.1
	<i>Eriaceus europaeus</i> (Hedgehog)	1.86X	ENSEEELUG00000000446 GeneScaffold_5083:215781-233965.1	ENSEEELUG000000004523 GeneScaffold_5082:985-76059.1	ENSEEELUG000000004637 GeneScaffold_5082:95143-106027.1	ENSEEELUG000000004688 GeneScaffold_5082:114423-125550.1
	<i>Tupaia belangeri</i> (Tree Shrew)	2X	ENSTREG000000002250 GeneScaffold_3191:283798-297944.1	ENSTREG000000003009 GeneScaffold_3191:383371-440831.1	ENSTREG0000000004173 GeneScaffold_3191:463-541-476-825	ENSTREG0000000005104 GeneScaffold_3191:485260-525777.1
SCANDENTIA	<i>Tarsius syrichta</i> (Tarsier)	1.82X	ENSTSYG000000009955 GeneScaffold_4816:549-67107.1	ENSTSYG000000012003 GeneScaffold_4815:897-48462.1	ENSTSYG000000011390 GeneScaffold_4817:26-5339.1	ENSTSYG000000012280 GeneScaffold_4817:26-5339.1
	<i>Otolemur garnettii</i> (Bushbaby)	1.5X	ENSOGAG000000006401 GeneScaffold_3006:89395-100429.1	ENSOGAG000000006402 GeneScaffold_3006:190790-254568.1	absent	ENSOGAG000000006402 GeneScaffold_3006:308141-320255.1
PRIMATES	<i>Microcebus murinus</i> (Mouse Lemur)	1.93X	ENSMICG000000003994 scaffold_568:82754-94374.1	ENSMICG000000004006 scaffold_568:17166-232202.1	ENSMICG000000004027 scaffold_568:25261-258554.1	ENSMICG000000004037 scaffold_568:267022-280232.1
	<i>Calithrix jacchus</i> (Marmoset)	6X	ENSCJAG000000012342 11:1071021.4-10782569.1	ENSCJAG000000012306 11:10812645-10877609.1	ENSCJAG000000012279 11:10889021-10904331.1	ENSCJAG000000012246 11:10914111-10929399.1
	<i>Macaca mulatta</i> (Macaque)	5.1X	ENSMMLUG000000004688 14:114577926-111745816.1	ENSMMLUG000000014328 14:111778513-111837307.1	ENSMMLUG000000014331 14:111852166-111855392.1	ENSMMLUG000000014334 14:111874406-111941325.1
	<i>Pongo pygmaeus</i> (Orangutan)	6X	ENSPPYG000000003883 11:109278390-110064543.1	ENSPPYG000000003884 11:10100792-110153360.1	UCSC	ENSPPYG000000003885 11:10192370-110212382.1
	<i>Gorilla gorilla</i>	2.1X	ENSGGOG000000013097 11:111259892-111345449.1	ENSGGOG000000003228 11:111381685-111435813.1	ENSGGOG000000003237 11:111455141-111468472.1	ENSGGOG000000003244 11:11147670-111542012.1
	<i>Pan troglodytes</i> (Chimpanzee)	6X	ENSPTRG000000004291 11:111759835-112076094.1	ENSPTRG000000004292 11:1112109519-112180130.1	ENSPTRG000000004293 11:1112184597-112196061.1	ENSPTRG000000004295 11:1112208040-112222883.1
	<i>Homo sapiens</i>	high	ENSGG00000149294 11:112881997-113149158.1	ENSGG00000149292 11:113185251-113254266.1	ENSGG00000170209 11:113258513-113271401.1	ENSGG00000149295 11:113280318-113346001.1

Table S1 (cont). Orthologues of genes in the NTAD cluster in 47 available vertebrate genomes, showing accession number and location.

Taxon	Genome	Coverage	NCAM1	TRC12	ANKK1	DRD2
CHIROPTERA	<i>Pteropus vampyrus</i> (Megabat)	2.63X	ENSPVAG00000007824 GeneScaffold_2166404868-466481.1	ENSPVAG000000007826 GeneScaffold_2166495074-539120.1	ENSPVAG00000012852 GeneScaffold_29771957-55761.1	ENSPVAG00000012853 GeneScaffold_297714954-21721.1
	<i>Myotis lucifugus</i> (Microbat)	7X	ENSMILUG00000011838 GeneScaffold_334548557-61150.1	ENSMILUG00000011834 GeneScaffold_3345344154-255563.1	ENSMILUG00000011881 GeneScaffold_3345291777-293760.1	ENSMILUG00000011890 GeneScaffold_33453302226-349693.1
CARNIVORA	<i>Felis catus</i> (Cat)	1.87X	ENSEFCAG00000013891 GeneScaffold_2791232882-301289.1	ENSEFCAG000000008291 GeneScaffold_279017645-63773.1	ENSEFCAG000000008292 GeneScaffold_2790:84437-101130.1	ENSEFCAG000000008293 GeneScaffold_2790:109558-412327.1
	<i>Canis familiaris</i> (Dog)	7.6X	ENSCAF600000013844 5:22907424-22969273:-1	ENSCAF600000013902 5:22839477-22881739:-1	ENSCAF600000013898 5:22810681-22822862:-1	ENSCAF600000013890 5:222791168-22802738:-1
	<i>Aturopoda melanoleuca</i> (Panola)	2X	ENSAMIEG00000016517 GI193553.1:69580-131079:-1	ENSAMIEG00000016494 GI193553.1:2181-47302:-1	ENSAMIEG00000006163 GI193846.1:430758-441555:-1	ENSAMIEG00000006143 GI193846.1:441593-423949:1
	<i>Bos taurus</i> (Cow)	7.1X	ENSBTAG00000005710 15:21855766-22058994:1	ENSBTAG00000010008 15:2152303-22197195:1	ENSBTAG00000010855 15:22225501-22235297:1	ENSBTAG00000010860 15:22246344-22259339:-1
ARTIODACTYLA	<i>Sus scrofa</i> (Pig)	4X	ENSSSCG00000015045 9:39876973-39943731:1	ENSSSCG00000015047 9:39974571-40018618:1	BLAST(80% id) 9:40074571-40076030:-1	ENSSSCG00000015048 9:40051843-40065065:1
	Vicugna pacos (Alpaca)	2.51X	ENSVPA60000000724 GeneScaffold_1967:356795-433389:1	ENSVPA60000000725 GeneScaffold_1967:464956-509310:1	absent blast (86% id.)	absent
CETACEA	<i>Tursiops truncatus</i> (Dolphin)	2.59X	ENSTTRG00000000675 GeneScaffold_1901:84476-148554:1	ENSTTRG00000010956 GeneScaffold_1900:5132-54722:1	ENSTTRG00000014457 scaffold_845489507-22715:-1	ENSTTRG000000007343 scaffold_11198475732-88099:1
PERISSODACTYLA	<i>Equus caballus</i> (Horse)	6.8X	ENSECAG00000019193 7:21647755-21713496:1	ENSECAG00000017966 7:21745287-21793507:1	ENSECAG00000011781 7:21816607-21827636:1	ENSECAG00000013567 7:21833004-21893006:-1
HYRACOIDEA	<i>Procavia capensis</i> (Hyrax)	2.19X	ENSPCAG00000005740 scaffold_149010531-76838:-1	ENSPCAG00000016245 GeneScaffold_4301:8305-47937:1	ENSPCAG00000006102 GeneScaffold_5824:10185-18859:1	ENSPCAG00000006199 GeneScaffold_5824:29553-42938:-1
PROBOSCIDEA	<i>Loxodonta africana</i> (Elephant)	7X	ENSLAF600000005371 scaffold_14741390575-1461424:1	ENSLAF600000017571 scaffold_5859908-112135:1	ENSLAF600000025747 scaffold_58151268-165444:1	ENSLAF600000006523 scaffold_58176422-189953:-1

Table S2. Transcription factors predicted by DECODE as regulators of the NTAD genes in humans.

Gene	Transcription factors
<i>NCAM1</i>	NF-κB , GR-α, GR-β, AP-1, c-Fos, c-Jun, p53, Sox9, POU2F1.
<i>TTC12*</i>	HOXA9B, Meis-1, RFX1, MIF-1, AREB6, Nkx3-1 v4, Nkx3-1, Nkx3-1 v1, Nkx3-1 v2, Nkx3-1 v3.
<i>ANKK1</i>	NF-κB , CUTL1, AREB6, oct-B3, oct-B2, Oct-B1, POU2F2, POU2F2 (Oct-2.1), POU2F1, POU2F2B, POU2F2C.
<i>DRD2</i>	NF-κB , Egr-1, CREB, GR-α, GR-β, δCREB, c-Rel, p300, NRSF form 1.

*Although NF-κB was not predicted as a regulator of *TTC12*, it regulates the *TTC12* paralogues *TOMM34* and *STIP1* as well as other genes encoding the tetratricopeptide repeat domain (not shown).

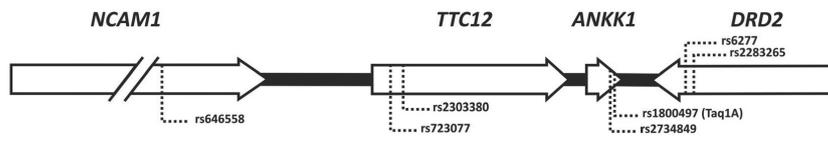


Figure S1- The NTAD cluster in the human genome, showing the single nucleotide polymorphisms (SNPs) included in this study. The sizes of the four genes are 317 kb, 69 kb, 13 kb and 66 kb, from left to right. Only *DRD2* is positioned in the reverse strand (arrow pointing to the left).

6

Capítulo 6

NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2 GENE CLUSTER AND THE CLINICAL AND GENETIC HETEROGENEITY OF ADULT ADHD

- Manuscrito em preparação -

***NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2* GENE CLUSTER AND THE CLINICAL AND GENETIC HETEROGENEITY OF ADULT ADHD**

Nina R. Mota^{1,2}, Diego L. Rovaris^{1,2}, Felipe A. Picon², Eduardo S. Vitola², Carlos A. I. Salgado², Rafael G. Karam², Paulo Belmonte-de-Abreu², Luis A. Rohde², Eugenio H. Grevet², Claiton H. D. Bau^{1,2}

¹Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

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

ABSTRACT

Attention Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) is a developmental psychiatric disorder that affects about 5,3% of children and its heritability is estimated at 76%. The estimated prevalence of ADHD in adults is around 4.4% and it is associated with a wide range of functional impairments across life domains and with higher occurrence of other psychiatric disorders. Both externalizing and internalizing disorders are frequently found in ADHD patients. Converging evidence have implicated dysfunctions of the dopamine neurotransmission pathways to the aetiology of ADHD. Two meta-analysis addressing the association of the dopamine receptor D2 (*DRD2*) gene and ADHD have shown a complex scenario, with inconclusive results due to excessive heterogeneity across studies. Most previous studies, including these meta-analyses, have analysed the well-known *ANKK1/DRD2* Taq1A (rs1800497) SNP as a marker of *DRD2* gene, which actually is located in a neighbour gene (*ANKK1*). Together with the *NCAM1* and *TTC12* genes, the *ANKK1* and the *DRD2* genes form the NTAD cluster, which has been shown to harbour multiple independent risk variants. As an attempt to address the reasons for the high heterogeneity previously reported on *DRD2* effects in ADHD, this study investigates the role of genetic variants from the NTAD cluster in the susceptibility to ADHD in adults and the modulation of associated comorbidities and personality profiles. For this study a sample of 520 adults with ADHD and 630 non-ADHD

controls was investigated. Diagnostic procedures were based on DSM-IV criteria and the Temperament and Character Inventory (TCI) was used to evaluate personality traits within the ADHD sample. Seven functional polymorphisms from the NTAD gene cluster were analysed (*NCAM1* rs646558; *TTC12* rs723077, rs2303380; *ANKK1* rs2734849, rs1800497; *DRD2* rs6277, rs2283265), both individually and in sliding-window haplotypes constructs using PLINK. Correction for multiple testing included 10,000 permutation for the SNP and global haplotype analyses (P_{corr}), while Bonferroni correction was used when testing the individual haplotypes. Our results show that the *DRD2* rs2283265 T allele was associated with increased risk for Major Depressive Disorder ($P=0.005$, $P_{\text{corr}}=0.023$) and with increased Harm Avoidance ($P=0.002$, $P_{\text{corr}}=0.013$) and decreased Persistence scores in ADHD patients ($P=0.002$, $P_{\text{corr}}=0.014$). Additionally, we were able to show that Major Depressive Disorder susceptibility among ADHD adults is independently associated with the *NCAM1* rs646558 ($P=0.005$, $P_{\text{corr}}=0.032$) and the *DRD2* rs2283265 SNPs. Furthermore, individual NTAD haplotypes, mostly centred in the *ANKK1-DRD2* region, are significantly associated with internalizing disorders, such as Major Depressive (significance ranged from $P=0.005$ to $P=0.012$) and Generalized Anxiety ($P=0.005$) disorders, and related personality traits, such as high Harm Avoidance ($P=0.002$ to $P=0.0016$) and low Persistence ($P=0.002$ to $P=0.007$) scores, within this sample of adults with ADHD. The SNPs and haplotypes associated in increased risk for such phenotypes are related to an overall low *DRD2* expression scenario, leading to lower dopaminergic activity. Although there was no individual SNP or haplotype significantly associated with ADHD itself after correcting for multiple tests, our findings provide support to the view that this gene cluster is involved in the clinical heterogeneity of adult ADHD. It is possible that the NTAD cluster, harbouring multiple risk variants that could have additive effects, may represent a shared genetic risk factor, influencing both internalizing and externalizing disorders susceptibility, depending on additional genetic background and epistatic interactions. These effects might in turn contribute to significant heterogeneity in odds ratios reported in previous meta-analyses of *DRD2/ANKK1* rs1800497 SNP in ADHD.

INTRODUCTION

Attention Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) is one of the most common developmental psychiatric disorders, affecting 5,3% of children worldwide (Polanczyck et al., 2007). The estimated prevalence of ADHD in adults is around 4.4% and it is associated with a wide range of functional impairments across life domains and with higher occurrence of other psychiatric disorders (Kessler et al., 2006; Biederman et al., 2006). High heritability estimates (around 76-80%) have been indicated for ADHD, both in children (Faraone et al., 2005) and adults (Chang et al., 2013).

ADHD, together with Substance Use Disorders (SUD), Oppositional Defiant Disorder (ODD) and Conduct Disorder (CD) are considered externalizing disorders, which are highly comorbid, share similar symptoms and common genetic factors (Kessler et al., 2011a,b; Arcos-Burgos et al., 2012). In the same sense, internalizing disorders, such as Major Depressive Disorder (MDD), Generalized Anxiety Disorder (GAD) and other mood- and anxiety-related disorders, also share similar symptoms and a common genetic background (Kendler et al., 2003; 2007; 2011; Kendler e Myers, 2013). Both externalizing and internalizing disorders are frequently found present in ADHD patients (Kessler et al., 2006; Jacob et al., 2007). There is evidence indicating that common underlying risk factors, such as shared genetic influences, may mediate the high comorbidity rates (Cosgrove et al., 2011; Arcos-Burgos et al., 2012).

Personality traits have also been suggested as possible common underlying factors, which could, in turn, share a common genetic background with different disorders (Young et al., 2000; Hink et al., 2013). Studies that have investigated the temperament profiles in adults with ADHD have quite consistently shown that they present higher scores on Novelty Seeking and Harm Avoidance dimensions than non-ADHD controls (Faraone et al., 2009; Jacob et al., 2007; Anckarsater et al., 2006; Downey et al., 1997). Reports on other dimensions are scarce, but there is some evidence suggesting the association of lower Persistence scores with ADHD (Faraone et al., 2009).

Converging evidence have implicated dysfunctions of the dopamine neurotransmission pathways to the etiology of ADHD (reviews in Tripp and Wickens 2009; Swanson et al., 2007; Genro et al., 2012). One of the most investigated and well-known polymorphisms in psychiatric genetics is the rs1800497 SNP, also known as *ANKK1/DRD2* Taq1A SNP. Two meta-analysis on the association of the dopamine receptor D2 (*DRD2*) gene and ADHD have shown a complex scenario, with inconclusive results (Wu et al., 2012; Gizer et al., 2009). Although a tendency towards association of the rs1800497 T allele with ADHD can be seen, in both cases, excessive heterogeneity in odds-ratios across studies has been reported and more thorough investigation of the sources of such association/heterogeneity is still needed (Wu et al., 2012; Gizer et al., 2009).

Additionally to these two inconclusive ADHD meta-analyses with the *ANKK1/DRD2* rs1800497 SNP, there are three meta-analyses assessing the role of this SNP in nicotine dependence and smoking behaviour traits, which have report conflicting results (Li et al., 2004; Munafò et al., 2004; 2009), thus its association with these phenotypes also remains unclear. In contrast, there are four meta-analyses supporting the association of this SNP with alcohol susceptibility (Munafò et al., 2007; Smith et al., 2008; Le Foll et al., 2009 e Wang et al., 2013). However, important heterogeneity can still be found even in these alcohol dependence meta-analyses (Le Foll et al., 2009; Wang et al., 2013).

In fact, although traditionally approached as a *DRD2* polymorphism, the rs1800497 SNP is located in a neighbor gene, the *ANKK1* (Neville et al., 2004). These two genes, together with the *NCAM1* and the *TTC12* genes, form the NTAD (*NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2*) gene cluster that is located in the Ch11q.22-23 region. An interesting aspect of this cluster comes from evidences suggesting it might work as a functional unit. Haplotypes spanning across genes from the NTAD cluster were associated with specific phenotypes (Gelernter et al., 2006; Yang et al 2007; 2008; Wernicke et al., 2009; David et al., 2010) and epistatic effects between SNPs from this region have been suggested (Ponce et al., 2008, Frank and Hutchinson 2009). Additionally, there is evidence that variation in one gene could indirectly alter the expression level of another gene in the same cluster (Huang et al. 2009).

In an attempt to identify the sources of incongruences between the rs1800497 SNP results across several behavior measures, in the past years the major focus of studies has changed from only looking into this single SNP effect to a broader range of genetic variation throughout the NTAD cluster. This approach was taken especially in studies regarding substance use disorders, with promising results. There is evidence suggesting the presence of multiple independent risk variants within this region and it has been shown that haplotypes comprising more than one gene from the NTAD cluster were associated with the susceptibility to nicotine, alcohol and other drugs dependence (Gelernter 2006; Yang et al., 2007, 2008; Ducci et al., 2011; Nelson et al., 2013).

As an attempt to address the reasons for heterogeneity in previous meta-analytic studies on *DRD2* effects in ADHD, this study investigates the role of genetic variants from the NTAD gene cluster in the susceptibility to ADHD in adults and the modulation of associated comorbidities and personality profiles.

MATERIALS AND METHODS

-Samples

The ADHD case/control analysis evaluated a sample of 520 adults with ADHD and 630 non-ADHD controls. All individuals were Native-Brazilian of European descent, had intelligent quotient higher than 70 points and had no history of psychosis or any significant neurological disease. Within the ADHD sample, the mean age was 33.83 (± 11.132) years and there were 269 men (51.7%) and 251 women (48.3%). Among controls, the mean age was 29.16 (± 8.693) years and there were 312 men (49.5%) and 318 women (50.5%).

- Diagnostic Procedures and Instruments

The diagnostic procedures applied for these samples have been described in details elsewhere (Grevet et al., 2006; de Cerqueira et al., 2011). In brief, ADHD and comorbidities within the ADHD sample were diagnosed according to DSM-IV (APA, 1994). The most common psychiatric comorbidities included MDD (190

cases; 36.5%), Bipolar Disorder (BD 83 cases; 16%), GAD (109 cases; 21%), Alcohol Abuse or Dependence (AAD 73 cases; 14%), Nicotine Dependence (ND 224 cases; 43%) and CD/Antisocial Personality Disorder (CD/ASPD 97 cases; 24.6%). The CD/ASPD variable includes individual with positive diagnoses for either CD or ASPD. The severity of ADHD and oppositional defiant symptoms was accessed by the Swanson, Nolan and Pelham rating scale, version IV (SNAP-IV; Swanson, 1992). The validated to Portuguese version (Fuentes et al., 1999) of the Temperament and Character Inventory (TCI; Cloninger et al., 1993) was used to access the four temperament dimensions of personality: Novelty Seeking, Harm Avoidance, Reward Dependence and Persistence.

-SNP selection, genotyping and LD analyses

For the SNP selection, prior published reports of association with behavioural outcomes, functional potential, minor allele frequency above 15% and assay validation evidence were considered. In total, 7 SNPs from the NTAD cluster were chosen for analyses: rs646558 (*NCAM1*), rs723077 (*TTC12*), rs2303380 (*TTC12*), rs2734849 (*ANKK1*), rs1800497 (*ANKK1*), rs6277 (*DRD2*) and rs2283265 (*DRD2*). Allelic discrimination analyses were carried using TaqMan assays (Applied Biosystems). Linkage disequilibrium (LD) coefficients (D') and haplotype blocks for the total sample (N=1150) were estimated using the Haploview software (Barrett et al, 2005). Haplotype blocks were identified according to Gabriel et al. (2002). SNP characteristics and allelic frequencies are shown in Table 1. Genotype frequencies did not deviate significantly from Hardy-Weinberg equilibrium. Pairwise LD structures for the seven SNPs studied, spanning from the *NCAM1* to the *DRD2* gene, are shown in Figure 1. The *ANKK1* and *DRD2* SNPs are in stronger LD with each other and with the *TTC12* rs2303380 SNP than with *TTC12* rs723077 and *NCAM1* rs646558 SNPs.

-Association of individual SNPs

Logistic Regression Analyses were performed to test the association of each SNP with ADHD and with six of the most common comorbidities within the ADHD sample (MDD, BD, GAD, AAD, ND and CD/ASPD). Additionally, linear regression analyses were conducted to access the effect of each SNP in ADHD

symptoms severity and in temperament traits within the ADHD sample. All analyses were performed using sex and age as covariates. To account for the multiple SNPs tested, corrected empirical P-values (P_{corr}) were generated by 10,000 permutation procedure using Max(T) permutation (--mperm 10000) implemented in PLINK (Purcell et al., 2007).

-Haplotype Analyses

Haplotype analyses were performed in PLINK (Purcell et al., 2007), using sliding windows of 2, 3, 4, 5, 6 and 7 SNPs (plink: --hap-window 2,3,4,5,6,7). Global association P-values (P_{gl}) were accessed by the Omnibus test (plink: --hap-omnibus), which jointly estimates all haplotype effects at a given position.

In order to avoid false positive findings, we performed a 10,000 permutation procedure which rendered global empirical P-values corrected for multiple comparisons (P_{glcorr}). Since this procedure may be over conservative, when a nominally significant global window ($P_{\text{gl}} \leq 0.05$) was obtained, analyses for individual haplotype effects were carried out for those specific windows, which were then submitted to Bonferroni correction afterwards.

For such, logistic and linear regression methods were applied, (plink: --hap-logistic or --hap-linear), which permitted the inclusion of sex and age as covariates. Haplotypes with frequency lower than 5% were not considered for this analysis. The significance threshold of the individual haplotype analyses within each window was adjusted by Bonferroni as the conventional $\alpha=0.05$ was divided by the number of major haplotypes with frequency greater than 5%.

RESULTS

Association of individual SNPs with ADHD and comorbidities

Analyses of individual SNPs did not reveal significant association with either ADHD (Table 2) or ADHD symptoms severity (data available upon request). Within the sample of adults with ADHD, logistic regression analyses, using sex and age as covariates, show SNPs from the *NCAM1*, *ANKK1* and *DRD2* genes associated

with MDD (rs646558 $P=0.005$, rs1800497 $P=0.025$ and rs2283265 $P=0.005$, respectively) and one SNP from the *ANKK1* gene associated with GAD (rs1800497 $P=0.034$) (Table 2). The *NCAM1* rs646558 A allele seems to decrease the odds of MDD ($OR_{(CI95\%)}=0.61_{(0.43-0.86)}$), while the *ANKK1* rs1800497 T allele and the *DRD2* rs2283265 T allele increase the odds of MDD ($OR_{(CI95\%)}=1.46_{(1.05-2.03)}$ and $OR_{(CI95\%)}=1.72_{(1.18-2.50)}$, respectively). The *ANKK1* rs1800497 T allele also confers risk to GAD ($OR_{(CI95\%)}=1.51_{(1.03-2.20)}$).

When accounting for the multiple SNPs tested, only the association of the *NCAM1* rs646558 and the *DRD2* rs2283265 SNPs with MDD remained significant after correction for multiple testing ($P_{corr}=0.032$ and $P_{corr}=0.023$, respectively). No association of individual SNPs was observed with BD, AAD, ND and CD/ASPD (Table 2).

In order to test if these associations of MDD with *NCAM1* and *DRD2* SNPs (which are not in LD; see Fig.1) were independent of one another, we included either the *NCAM1* rs646558 or the *DRD2* rs2283265 SNP as covariates on a secondary logistic analyses round. When controlling for the rs646558 status, the association results with MDD seemed to be even stronger for the significantly associated *DRD2* rs2283265 ($OR=1.83$ $P=0.002$ $P_{corr}=0.013$) SNP, as well as the nominally associated *ANKK1* rs1800497 ($OR=1.54$ $P=0.012$ $P_{corr}=0.054$) SNP. Similarly, when controlling for the rs2283265 status, the association between MDD and *NCAM1* rs646558 SNP remained significant ($OR=0.59$ $P=0.0003$ $P_{corr}=0.022$). These results suggest that these *NCAM1* and *DRD2* (or *ANKK1*) SNPs do indeed have independent effects on MDD susceptibility.

Association of individual SNPs with personality traits

Linear regression analyses of temperament traits within the adult ADHD sample revealed that Harm Avoidance was associated with the two SNPs from the *ANKK1* gene (rs2734849 $P=0.025$ and rs1800497 $P=0.009$) and the two SNPs from the *DRD2* gene (rs6277 $P=0.010$ and rs2283265 $P=0.002$) (Table 3). The Persistence trait was also associated with the *ANKK1* rs1800497 SNP ($P=0.029$) and the *DRD2* rs2283265 SNP ($P=0.002$). When applying multiple test correction, the association of the *DRD2* rs2283265 SNP with Harm Avoidance and with

Persistence scores remained significant ($P_{\text{corr}}=0.013$ and $P_{\text{corr}}=0.014$, respectively). Meanwhile, the *ANKK1* rs1800497 and the *DRD2* rs6277 were only marginally associated with Harm avoidance after correction ($P_{\text{corr}}=0.056$ and $P_{\text{corr}}=0.059$, respectively) (Table 3).

Haplotype effects on ADHD and comorbidities

As can be seen in Table 4, although several haplotype windows were nominally associated to either ADHD, MDD and GAD, no global haplotype window remained significant after correction for multiple tests was applied (see Methods). Nevertheless, individual haplotype analyses were carried out for the nominally associated global haplotype sets, as referred in the Methods section.

In the global haplotype analyses for ADHD, there were two haplotype windows with $P_{\text{gl}}<0.05$ (Supplementary Table 1a). These are centred in the *ANKK1-DRD2* region: a 3-SNP haplotype window including the rs1800497-rs6277-rs2283265 ($P_{\text{gl}}=0.045$) and a 4-SNP haplotype window including all four SNPs from this region (rs2734849-rs1800497-rs6277-rs2283265 ($P_{\text{gl}}=0.035$)). The individual haplotype analyses within these selected haplotype windows indicated that the A-T-C-T haplotype from rs2734849-rs1800497-rs6277-rs2283265 could exert a protective effect over ADHD susceptibility (OR=0.77; $P=0.034$) (Table 4). For the other haplotype window analysed, no individual haplotype was found to be associated with ADHD.

The MDD haplotype analyses showed four haplotype windows with $P_{\text{gl}}<0.05$ (Supplementary Table 1b). Individual haplotype analyses within these associated windows are shown in Table 4. Two non-overlapping regions may affect MDD susceptibility, one involving *NCAM1-TTC12* and the other centred around *ANKK1-DRD2*. For the *NCAM1-TTC12* set of haplotypes, the 2-SNP A-C haplotype (rs646558-rs723077) presents a nominal association with lower risk for MDD (OR=0.53; $P=0.019$) and in the 3-SNP haplotype window (rs646558-rs723077-rs2303380) two haplotypes, C-C-G and A-C-A, were nominally associated with risk (OR=1.85; $P=0.008$) and protective (OR=0.47; $P=0.029$) effects, respectively. None of these individual haplotypes, however, remained significant after Bonferroni correction. In contrast, the *ANKK1-DRD2* (and *DRD2-*

only) associated haplotypes survived the multiple tests correction; the rs2734849 A, the rs1800497 T, the rs6277 C and the rs2283265 T alleles form 2-, 3- and 4-SNP haplotypes that are associated with increased odds for MDD (Table 4).

Concerning the effects on BD, there were two associated haplotype windows with $P_{gl} < 0.05$, both of them including SNPs from the *ANKK1* and *DRD2* genes (Supplementary Table 1b). Individual haplotype analyses, however, did not reveal any specific haplotype associated with BD.

The global haplotype association analyses with GAD revealed three haplotype windows with $P_{gl} < 0.05$ (Supplementary Table 1b). One specific haplotype for each set was associated with GAD in the individual analyses, but only the 5-SNP *TTC12-DRD2* haplotype remained significant after Bonferroni correction. These haplotypes are highly overlapping with each other and they also overlap with the ones associated to MDD, with the alleles consistently showing the same direction of effect.

Haplotype effects on personality traits

Seven haplotype windows were associated with Harm Avoidance at $P_{gl} < 0.05$, but only one of them remained significant after correction for multiple tests. Haplotype analyses of Persistence dimension also revealed two nominally associated haplotype windows at $P_{gl} < 0.05$, which did not reach significance threshold after correction. No significant effect was observed for Novelty Seeking or Reward Dependence (Supplementary Table 1c).

All seven haplotypes windows presented individual pairs of haplotypes, with opposite effects, associated with Harm Avoidance. Most of them remained significant after Bonferroni correction (Table 5) and these overlapping haplotypes include SNPs from the *DRD2* and/or *ANKK1* genes. Both protective and risk haplotypes were revealed at each window, with all shared alleles consistently associated in the same direction (i.e. each allele is involved in either a protective or risk effect). Haplotypes of different window-sizes (2- to 5-SNPs) involving the A, T, C, T alleles from the rs2734849, rs1800497, rs6277 and rs2283265 SNPs, respectively, are associated with an increase in Harm Avoidance scores, while the

G, C, T, G alleles from these SNPs confer decreased Harm Avoidance scores (Table 5).

The *ANKK1* and *DRD2* SNPs also compose the haplotypes associated with the Persistence dimension (Table 5). In this case, however, all associated haplotypes confer decreased Persistence scores and remained significant after correction. Interestingly, the three individually associated haplotypes that confer lower Persistence scores are all associated with increased Harm Avoidance scores.

DISCUSSION

The present results have shown that NTAD polymorphisms, mostly centred in the *ANKK1-DRD2* region, are associated with internalizing disorders and related personality traits within a large sample of adults with ADHD. While our findings suggest that this gene cluster is not directly associated to ADHD itself, they provide support to the view that this gene cluster is involved in the clinical heterogeneity of adult ADHD. They also contribute to the explanation of the significant heterogeneity in odds ratios reported in previous meta-analyses of *DRD2/ANKK1* rs1800497 SNP in ADHD (Gizer et al., 2009; Wu et al., 2012).

Despite the *DRD2/ANKK1* rs1800497 SNP being one of the most intensively investigated polymorphisms in psychiatric genetics, only a handful of studies performed an inclusive analysis with other SNPs that are part of the NTAD gene cluster. To the best of our knowledge, this is the first study to consider the four NTAD genes (*NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2*) as a cluster in the susceptibility of adult ADHD, as well as its effect on the most frequent comorbidities and personality traits in adults with ADHD.

The results involving haplotypes spanning the *ANKK1-DRD2* genes with MDD, GAD, high Harm Avoidance and low Persistence scores in adults with ADHD are in agreement with previous results associating SNPs from this region with related internalizing traits in non-ADHD samples. For example, the rs1800497

T allele has been associated with higher anxiety/insomnia, social dysfunction and depression scores in post-traumatic stress disorder patients (Lawford et al., 2006), with anxious and depressive symptoms in children (Hayden et al., 2010) and with MDD susceptibility in men (Roetker et al., 2012). Additionally, the association findings were not restricted to the rs1800497 SNP as other SNPs from this region were also associated with MDD symptoms severity (Huuhka et al., 2008), susceptibility (Wang et al., 2013; Roetker et al., 2012) and treatment response traits (Wang et al., 2013; Huuhka et al., 2008).

The results from the present study support previous inferences by showing that MDD susceptibility among ADHD adults is independently associated with *NCAM1* and *DRD2* SNPs. Studies on SUD-related phenotypes such as nicotine, alcohol and drug dependence have indicated that the NTAD gene cluster harbours multiple genetic risk variants (Gelernter et al., 2006; Yang et al., 2007; 2008), which is consistent with the hypothesis that these four genes may be functionally related (Yang et al., 2007). Thus it is unlikely that the association findings involving this gene cluster are due to the effect of a single variant (the rs1800497, for example) and suggests that multiple polymorphisms in these genes may contribute to the same phenotypes.

Taken together, our findings and the overall literature show that variations in the NTAD cluster may also exert a pleiotropic effect since the SNPs and haplotype regions that were found here associated with internalizing phenotypes were previously implicated in externalizing characteristics, specially SUD (Gelernter et al., 2006; Yang et al., 2007; 2008; Ducci et al., 2011; Nelson et al., 2013). A possible explanation is that this gene cluster in fact represents a “general vulnerability factor” that could have different effects depending on additional genetic and environmental background effects and involvement in epistatic interactions. Although inferences are scarce about the *TTC12* functionality, there is more evidence on the nervous system effects of the *NCAM1*, *ANKK1* and *DRD2* genes. The protein encoded by *NCAM1* (NCAM) is involved in a wide range of brain functions, including neuronal adhesion, neurite outgrowth, synaptic plasticity, and signalling transduction (Walmod et al., 2004). It has been shown that *NCAM1* expression profiles are related to MDD in humans (Tochigi et al., 2008; Varea et

al., 2012) and deletion of *NCAM1* results in depression-like (Aonurm-Helm et al., 2008; Jurgenson et al., 2012) and anxiety-like (Stork et al., 1999) behaviours in animal models. Additionally, NCAM has been proposed as a modulator of the dopaminergic system and a potential pharmacological target for dopamine-related psychiatric disorders as it has been shown that NCAM can regulate DRD2 signalling by promoting DRD2 internalization/desensitization and subsequent degradation (Xiao et al., 2009). This may represent a possible mechanism underlying the association findings shown in the present study between polymorphisms in both *NCAM1* and *DRD2* genes and MDD susceptibility.

The *ANKK1/DRD2* haplotypes associated with internalizing phenotypes in the present study (formed by the rs2734849-A, rs1800497-T, rs6277-C and rs2283265-T alleles) possibly represent an overall low *DRD2* expression scenario, leading to lower dopaminergic activity. For instance, reduced D2 receptors binding potential in the striatum has been shown in individuals who carry the *ANKK1* rs1800497 T allele (Thompson et al., 1997; Pohjalainen et al., 1998; Jonsson et al., 1999) and in *DRD2* rs6277 C allele carriers (Hirvonen et al., 2004;2005,2009). These findings could explain the associations with both externalizing and internalizing disorders, since low dopaminergic theory has been proposed to ADHD (Levy et al., 1991), SUD (review in Melis et al., 2005; Diana, 2011) and has also been linked to MDD (Klimek et al., 2002; Dunlop and Nemeroff 2007).

Some limitations in the present study should be pointed out. Although 520 individuals from the same population represent one of the larger samples of adults with ADHD, we may still be underpowered for the statistical analyses performed. Additionally, individual haplotype analyses were carried out for the nominally associated global haplotype sets as an exploratory investigation, acknowledging the increased risk of false positive findings. This procedure, however, was balanced by the multiple overlapping haplotypes, with alleles consistently implicated in the same direction of effect, associated with correlated phenotypes. Also, the effects of these genetic polymorphisms on comorbid disorders among ADHD individuals may not directly relate to their effect on such disorders in the absence of ADHD. Thus, further studies addressing these effects both in ADHD

and non-ADHD samples seems to be crucial for obtaining a clearer scenario of the effect of the NTAD gene cluster on behaviour modulation.

The present study contributes to the current knowledge on the possible causes of the high heterogeneity found between studies assessing the role of the *ANKK1/DRD2* rs1800497 in ADHD (Gizer et al., 2009; Wu et al., 2012) as well as in smoking behaviour (Li et al., 2004; Munafò et al., 2004; 2009) and alcohol dependence (Munafò et al. 2007, Smith et al. 2008, Le Foll et al., 2009 e Wang et al. 2013). Our findings suggest that rs1800497 is located in a region that harbours multiple polymorphisms independently implicated (probably through deficits in dopaminergic function) in behavioural phenotypes such as temperament as well as comorbidity rates. Considering the evidence that temperament traits, such as Harm Avoidance for example, could underlie the vulnerability to both externalizing (Downey et al., 1997; Jacob et al., 2007; Faraone et al., 2009; Etter et al 2010; Teh et al., 2012; Milivojevic et al., 2012) and internalizing (Ongur et al., 2005; Purper-Ouakil et al., 2010; Miettunen and Raevuori, 2012) disorders, it is likely that sample differences in both temperament and comorbidity profiles may modify the odds for association between rs1800497 and other SNPs in the NTAD cluster and various psychiatric disorders, including ADHD and SUD.

REFERENCES

- American Psychiatric Association (1994). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. (4th ed.). Washington DC.
- Anckarsäter, H., Stahlberg, O., Larson, T., Hakansson, C., Jutblad, S.-B., Niklasson, L., Nydén, A., Wentz, E., Westergren, S., Cloninger, C. R., et al. (2006). The impact of ADHD and autism spectrum disorders on temperament, character, and personality development. *Am J Psychiatry* 163, 1239–1244.
- Aonurm-Helm, A., Jürgenson, M., Zharkovsky, T., Sonn, K., Berezin, V., Bock, E., and Zharkovsky, A. (2008). Depression-like behaviour in neural cell adhesion molecule (NCAM)-deficient mice and its reversal by an NCAM-derived peptide, FGL. *Eur. J. Neurosci.* 28, 1618–1628.
- Arcos-Burgos, M., Vélez, J. I., Solomon, B. D., and Muenke, M. (2012). A common genetic network underlies substance use disorders and disruptive or externalizing disorders. *Hum Genet* 131, 917–929.
- Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J., and Daly, M. J. (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21, 263–265.
- Biederman, J., Faraone, S. V., Spencer, T. J., Mick, E., Monuteaux, M. C., and Aleardi, M. (2006). Functional impairments in adults with self-reports of diagnosed ADHD: A controlled study of 1001 adults in the community. *J Clin Psychiatry* 67, 524–540.
- Chang, Z., Lichtenstein, P., Asherson, P. J., and Larsson, H. (2013). Developmental twin study of attention problems: high heritabilities throughout development. *JAMA Psychiatry* 70, 311–318.
- Cloninger, C. R., Svrakic, D. M., and Przybeck, T. R. (1993). A psychobiological model of temperament and character. *Arch. Gen. Psychiatry* 50, 975–990.
- Cosgrove, V. E., Rhee, S. H., Gelhorn, H. L., Boeldt, D., Corley, R. C., Ehringer, M. A., Young, S. E., and Hewitt, J. K. (2011). Structure and etiology of co-occurring internalizing and externalizing disorders in adolescents. *J Abnorm Child Psychol* 39, 109–123.
- de Cerqueira, C. C. S., Polina, E. R., Contini, V., Marques, F. Z. C., Grevet, E. H., Salgado, C. A. I., da Silva, P. O. G., Picon, F. A., Belmonte-de-Abreu, P., and Bau, C. H. D. (2011). ADRA2A polymorphisms and ADHD in adults: possible mediating effect of personality. *Psychiatry Research* 186, 345–350.

- Diana, M. (2011). The dopamine hypothesis of drug addiction and its potential therapeutic value. *Front Psychiatry* 2, 64.
- Downey, K. K., Stelson, F. W., Pomerleau, O. F., and Giordani, B. (1997). Adult attention deficit hyperactivity disorder: psychological test profiles in a clinical population. *The Journal of Nervous and Mental Disease* 185, 32–38.
- Ducci, F., Kaakinen, M., Pouta, A., Hartikainen, A.-L., Veijola, J., Isohanni, M., Charoen, P., Coin, L., Hoggart, C., Ekelund, J., et al. (2011). TTC12-ANKK1-DRD2 and CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 influence different pathways leading to smoking behavior from adolescence to mid-adulthood. *Biological Psychiatry* 69, 650–660.
- Dunlop, B. W., and Nemeroff, C. B. (2007). The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Arch. Gen. Psychiatry* 64, 327–337.
- Etter, J.-F. (2010). Smoking and Cloninger's Temperament and Character Inventory. *Nicotine & Tobacco Res.* 12, 919–926.
- Faraone, S. V., Perlis, R. H., Doyle, A. E., Smoller, J. W., Goralnick, J. J., Holmgren, M. A., and Sklar, P. (2005). Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *BPS* 57, 1313–1323.
- Faraone, S. V., Kunwar, A., Adamson, J., and Biederman, J. (2009). Personality traits among ADHD adults: implications of late-onset and subthreshold diagnoses. *Psychol. Med.* 39, 685–693.
- Frank, M. J., and Hutchison, K. (2009). Genetic contributions to avoidance-based decisions: striatal D2 receptor polymorphisms. *Neuroscience* 164, 131–140.
- Fuentes D, Tavares H, Camargo CHP, Gorenstein C. (1999) Inventário de Temperamento e Caráter de Cloninger — validação da versão em Português. *Revista de Psiquiatria Clínica.* 26: 363–376.
- Gabriel, S. B., Schaffner, S. F., Nguyen, H., Moore, J. M., Roy, J., Blumenstiel, B., Higgins, J., DeFelice, M., Lochner, A., Faggart, M., et al. (2002). The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296, 2225–2229.
- Gelernter, J., Yu, Y., Weiss, R., Brady, K., Panhuysen, C., Yang, B.-Z., Kranzler, H. R., and Farrer, L. (2006). Haplotype spanning TTC12 and ANKK1, flanked by the DRD2 and NCAM1 loci, is strongly associated to nicotine dependence in two distinct American populations. *Human Molecular Genetics* 15, 3498–3507.
- Genro, J.P., Kieling, C., Rohde, L.A., & Hutz, M.H. (2010). Attention-deficit/

hyperactivity disorder and the dopaminergic hypotheses. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 10, 587–601.

Gizer, I. R., Ficks, C., and Waldman, I. D. (2009). Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet* 126, 51–90.

Grevet, E. H., Bau, C. H. D., Salgado, C. A. I., Fischer, A. G., Kalil, K., Victor, M. M., Garcia, C. R., Sousa, N. O., Rohde, L. A., and Belmonte-de-Abreu, P. (2006). Lack of gender effects on subtype outcomes in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: support for the validity of subtypes. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 256, 311–319.

Hayden, E. P., Klein, D. N., Dougherty, L. R., Olino, T. M., Lipton, R. S., Dyson, M. W., Bufferd, S. J., Durbin, C. E., Sheikh, H. I., and Singh, S. M. (2010). The dopamine D2 receptor gene and depressive and anxious symptoms in childhood: associations and evidence for gene-environment correlation and gene-environment interaction. *Psychiatric Genetics* 20, 304–310.

Hink, L. K., Rhee, S. H., Corley, R. P., Cosgrove, V. E., Hewitt, J. K., Schulz-Heik, R. J., Lahey, B. B., and Waldman, I. D. (2013). Personality Dimensions as Common and Broadband-Specific Features for Internalizing and Externalizing Disorders. *J Abnorm Child Psychol*.

Hirvonen, M., Laakso, A., Någren, K., Rinne, J. O., Pohjalainen, T., and Hietala, J. (2004). C957T polymorphism of the dopamine D2 receptor (DRD2) gene affects striatal DRD2 availability in vivo. *Mol Psychiatry* 9, 1060–1061.

Hirvonen, M., Laakso, A., Någren, K., Rinne, J. O., Pohjalainen, T., and Hietala, J. (2005). C957T polymorphism of the dopamine D2 receptor (DRD2) gene affects striatal DRD2 availability in vivo. *Mol Psychiatry* 10, 889–889.

Hirvonen, M. M., Laakso, A., Någren, K., Rinne, J. O., Pohjalainen, T., and Hietala, J. (2009). C957T polymorphism of dopamine D2 receptor gene affects striatal DRD2 in vivo availability by changing the receptor affinity. *Synapse* 63, 907–912.

Huang, W., Payne, T. J., Ma, J. Z., Beuten, J., Dupont, R. T., Inohara, N., and Li, M. D. (2009). Significant association of ANKK1 and detection of a functional polymorphism with nicotine dependence in an African-American sample. *Neuropsychopharmacology* 34, 319–330.

Huuhka, K., Anttila, S., Huuhka, M., Hietala, J., Huhtala, H., Mononen, N., Lehtimäki, T., and Leinonen, E. (2008). Dopamine 2 receptor C957T and catechol-o-methyltransferase Val158Met polymorphisms are associated with

treatment response in electroconvulsive therapy. *Neuroscience Letters* 448, 79–83.

Jacob, C. P., Romanos, J., Dempfle, A., Heine, M., Windemuth-Kieselbach, C., Kruse, A., Reif, A., Walitza, S., Romanos, M., Strobel, A., et al. (2007). Co-morbidity of adult attention-deficit/hyperactivity disorder with focus on personality traits and related disorders in a tertiary referral center. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 257, 309–317.

Jönsson, E. G., Nothen, M. M., Grünhage, F., Farde, L., Nakashima, Y., Propping, P., and Sedvall, G. C. (1999). Polymorphisms in the dopamine D2 receptor gene and their relationships to striatal dopamine receptor density of healthy volunteers. *Mol Psychiatry* 4, 290–296.

Jürgenson, M., Aonurm-Helm, A., and Zharkovsky, A. (2012). Partial reduction in neural cell adhesion molecule (NCAM) in heterozygous mice induces depression-related behaviour without cognitive impairment. *Brain Research* 1447, 106–118.

Kendler, K. S., Gardner, C. O., Gatz, M., and Pedersen, N. L. (2007). The sources of co-morbidity between major depression and generalized anxiety disorder in a Swedish national twin sample. *Psychol. Med.* 37, 453–462.

Kendler, K. S., Prescott, C. A., Myers, J., and Neale, M. C. (2003). The structure of genetic and environmental risk factors for common psychiatric and substance use disorders in men and women. *Arch. Gen. Psychiatry* 60, 929–937.

Kendler, K. S., Aggen, S. H., Knudsen, G. P., Røysamb, E., Neale, M. C., and Reichborn-Kjennerud, T. (2011). The structure of genetic and environmental risk factors for syndromal and subsyndromal common DSM-IV axis I and all axis II disorders. *American Journal of Psychiatry* 168, 29–39.

Kendler, K. S., and Myers, J. (2013). The boundaries of the internalizing and externalizing genetic spectra in men and women. *Psychol. Med.*, 1–9.

Kessler, R. C., Adler, L., Barkley, R., Biederman, J., Conners, C. K., Demler, O., Faraone, S. V., Greenhill, L. L., Howes, M. J., Secnik, K., et al. (2006). The prevalence and correlates of adult ADHD in the United States: results from the National Comorbidity Survey Replication. *Am J Psychiatry* 163, 716–723.

Kessler, R. C., Ormel, J., Petukhova, M., McLaughlin, K. A., Green, J. G., Russo, L. J., Stein, D. J., Zaslavsky, A. M., Aguilar-Gaxiola, S., Alonso, J., et al. (2011a). Development of lifetime comorbidity in the World Health Organization world mental health surveys. *Arch. Gen. Psychiatry* 68, 90–100.

- Kessler, R. C., Petukhova, M., and Zaslavsky, A. M. (2011b). The role of latent internalizing and externalizing predispositions in accounting for the development of comorbidity among common mental disorders. *Curr Opin Psychiatry* 24, 307–312.
- Klimek, V., Schenck, J. E., Han, H., Stockmeier, C. A., and Ordway, G. A. (2002). Dopaminergic abnormalities in amygdaloid nuclei in major depression: a postmortem study. *BPS* 52, 740–748.
- Lawford, B. R., Young, R., Noble, E. P., Kann, B., and Ritchie, T. (2006). The D2 dopamine receptor (DRD2) gene is associated with co-morbid depression, anxiety and social dysfunction in untreated veterans with post-traumatic stress disorder. *Eur. Psychiatry* 21, 180–185.
- Le Foll, B., Gallo, A., Le Strat, Y., Lu, L., and Gorwood, P. (2009). Genetics of dopamine receptors and drug addiction: a comprehensive review. *Behavioural Pharmacology* 20, 1–17.
- Li, M., Ma, J., and Beuten, J. (2004). Progress in searching for susceptibility loci and genes for smoking-related behaviour. *Clinical Genetics* 66, 382–392.
- Melis, M., Spiga, S., and Diana, M. (2005). The dopamine hypothesis of drug addiction: hypodopaminergic state. *Int. Rev. Neurobiol.* 63, 101–154.
- Miettunen, J., and Raevuori, A. (2012). A meta-analysis of temperament in axis I psychiatric disorders. *Comprehensive Psychiatry* 53, 152–166.
- Milivojevic, D., Milovanovic, S. D., Jovanovic, M., Svrakic, D. M., Svrakic, N. M., Svrakic, S. M., and Cloninger, C. R. (2012). Temperament and character modify risk of drug addiction and influence choice of drugs. *Am J Addict* 21, 462–467.
- Munafò, M., Clark, T., Johnstone, E., Murphy, M., and Walton, R. (2004). The genetic basis for smoking behavior: a systematic review and meta-analysis. *Nicotine Tob. Res.* 6, 583–597.
- Munafò, M. R., Matheson, I. J., and Flint, J. (2007). Association of the DRD2 gene Taq1A polymorphism and alcoholism: a meta-analysis of case-control studies and evidence of publication bias. *Mol Psychiatry* 12, 454–461.
- Munafò, M. R., Timpson, N. J., David, S. P., Ebrahim, S., and Lawlor, D. A. (2009). Association of the DRD2 gene Taq1A polymorphism and smoking behavior: a meta-analysis and new data. *Nicotine Tob. Res.* 11, 64–76.

- Nelson, E. C., Lynskey, M. T., Heath, A. C., Wray, N., Agrawal, A., Shand, F. L., Henders, A. K., Wallace, L., Todorov, A. A., Schrage, A. J., et al. (2013). ANKK1, TTC12, and NCAM1 polymorphisms and heroin dependence: importance of considering drug exposure. *JAMA Psychiatry* 70, 325–333.
- Neville, M. J., Johnstone, E. C., and Walton, R. T. (2004). Identification and characterization of ANKK1: a novel kinase gene closely linked to DRD2 on chromosome band 11q23.1. *Hum. Mutat.* 23, 540–545.
- Ongur, D., Farabaugh, A., Iosifescu, D. V., Perlis, R., and Fava, M. (2005). Tridimensional personality questionnaire factors in major depressive disorder: relationship to anxiety disorder comorbidity and age of onset. *Psychother Psychosom* 74, 173–178.
- Pohjalainen, T., Rinne, J. O., Någren, K., Lehtikainen, P., Anttila, K., Syvälahti, E. K., and Hietala, J. (1998). The A1 allele of the human D2 dopamine receptor gene predicts low D2 receptor availability in healthy volunteers. *Mol Psychiatry* 3, 256–260.
- Polanczyk, G., de Lima, M. S., Horta, B. L., Biederman, J., and Rohde, L. A. (2007). The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and meta-regression analysis. *Am J Psychiatry* 164, 942–948.
- Ponce, G., Hoenicka, J., Jiménez-Arriero, M. A., Rodríguez-Jiménez, R., Aragues, M., Martín-Sune, N., Huertas, E., and Palomo, T. (2008). DRD2 and ANKK1 genotype in alcohol-dependent patients with psychopathic traits: association and interaction study. *The British Journal of Psychiatry* 193, 121–125.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P. I. W., Daly, M. J., et al. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 559–575.
- Purper-Ouakil, D., Cortese, S., Wohl, M., Aubron, V., Orejarena, S., Michel, G., Asch, M., Mouren, M.-C., and Gorwood, P. (2010). Temperament and character dimensions associated with clinical characteristics and treatment outcome in attention-deficit/hyperactivity disorder boys. *Comprehensive Psychiatry* 51, 286–292.
- Roetker, N. S., Yonker, J. A., Lee, C., Chang, V., Basson, J. J., Roan, C. L., Hauser, T. S., Hauser, R. M., and Atwood, C. S. (2012). Multigene interactions and the prediction of depression in the Wisconsin Longitudinal Study. *BMJ Open* 2.

- Smith, L., Watson, M., Gates, S., Ball, D., and Foxcroft, D. (2008). Meta-analysis of the association of the Taq1A polymorphism with the risk of alcohol dependency: a HuGE gene-disease association review. *American Journal of Epidemiology* 167, 125–138.
- Stork, O., Welzl, H., Wotjak, C. T., Hoyer, D., Delling, M., Cremer, H., and Schachner, M. (1999). Anxiety and increased 5-HT1A receptor response in NCAM null mutant mice. *J. Neurobiol.* 40, 343–355.
- Swanson JM.(1992) School-based assessments and interventions for ADD students. Irvine, CA: KC Publishing
- Swanson, J. M., Kinsbourne, M., Nigg, J., Lanphear, B., Stefanatos, G. A., Volkow, N., Taylor, E., Casey, B. J., Castellanos, F. X., and Wadhwa, P. D. (2007). Etiologic subtypes of attention-deficit/hyperactivity disorder: brain imaging, molecular genetic and environmental factors and the dopamine hypothesis. *Neuropsychol Rev* 17, 39–59.
- Teh, L. K., Izuddin, A. F., M H, F. H., Zakaria, Z. A., and Salleh, M. Z. (2012). Tridimensional personalities and polymorphism of dopamine D2 receptor among heroin addicts. *Biological Research For Nursing* 14, 188–196.
- Thompson, J., Thomas, N., Singleton, A., Piggott, M., Lloyd, S., Perry, E. K., Morris, C. M., Perry, R. H., Ferrier, I. N., and Court, J. A. (1997). D2 dopamine receptor gene (DRD2) Taq1 A polymorphism: reduced dopamine D2 receptor binding in the human striatum associated with the A1 allele. *Pharmacogenetics* 7, 479–484.
- Tochigi, M., Iwamoto, K., Bundo, M., Sasaki, T., Kato, N., and Kato, T. (2008). Gene expression profiling of major depression and suicide in the prefrontal cortex of postmortem brains. *Neurosci. Res.* 60, 184–191.
- Tripp, G., and Wickens, J. R. (2009). Neurobiology of ADHD. *Neuropharmacology* 57, 579–589.
- Varea, E., Guirado, R., Gilabert-Juan, J., Martí, U., Castillo-Gómez, E., Blasco-Ibáñez, J. M., Crespo, C., and Náchter, J. (2012). Expression of PSA-NCAM and synaptic proteins in the amygdala of psychiatric disorder patients. *Journal of Psychiatric Research* 46, 189–197.
- Walmod, P. S., Kolkova, K., Berezin, V., and Bock, E. (2004). Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction. *Neurochem Res* 29, 2015–2035.

- Wang, F., Simen, A., Arias, A., Lu, Q.-W., and Zhang, H. (2013). A large-scale meta-analysis of the association between the ANKK1/DRD2 Taq1A polymorphism and alcohol dependence. *Hum Genet* 132, 347–358.
- Wernicke, C., Reese, J., Kraschewski, A., Winterer, G., Rommelspacher, H., and Gallinat, J. (2009). Distinct haplotypes of the dopamine D2 receptor gene are associated with non-smoking behaviour and daily cigarette consumption. *Pharmacopsychiatry* 42, 41–50.
- Wu, J., Xiao, H., Sun, H., Zou, L., and Zhu, L.-Q. (2012). Role of dopamine receptors in ADHD: a systematic meta-analysis. *Mol Neurobiol* 45, 605–620.
- Xiao, M.-F., Xu, J.-C., Tereshchenko, Y., Novak, D., Schachner, M., and Kleene, R. (2009). Neural cell adhesion molecule modulates dopaminergic signaling and behavior by regulating dopamine D2 receptor internalization. *Journal of Neuroscience* 29, 14752–14763.
- Yang, B.-Z., Kranzler, H. R., Zhao, H., Gruen, J. R., Luo, X., and Gelernter, J. (2007). Association of haplotypic variants in DRD2, ANKK1, TTC12 and NCAM1 to alcohol dependence in independent case control and family samples. *Human Molecular Genetics* 16, 2844–2853.
- Yang, B.-Z., Kranzler, H. R., Zhao, H., Gruen, J. R., Luo, X., and Gelernter, J. (2008). Haplotypic variants in DRD2, ANKK1, TTC12, and NCAM1 are associated with comorbid alcohol and drug dependence. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 32, 2117–2127.
- Young, S. E., Stallings, M. C., Corley, R. P., Krauter, K. S., and Hewitt, J. K. (2000). Genetic and environmental influences on behavioral disinhibition. *Am. J. Med. Genet.* 96, 684–695.

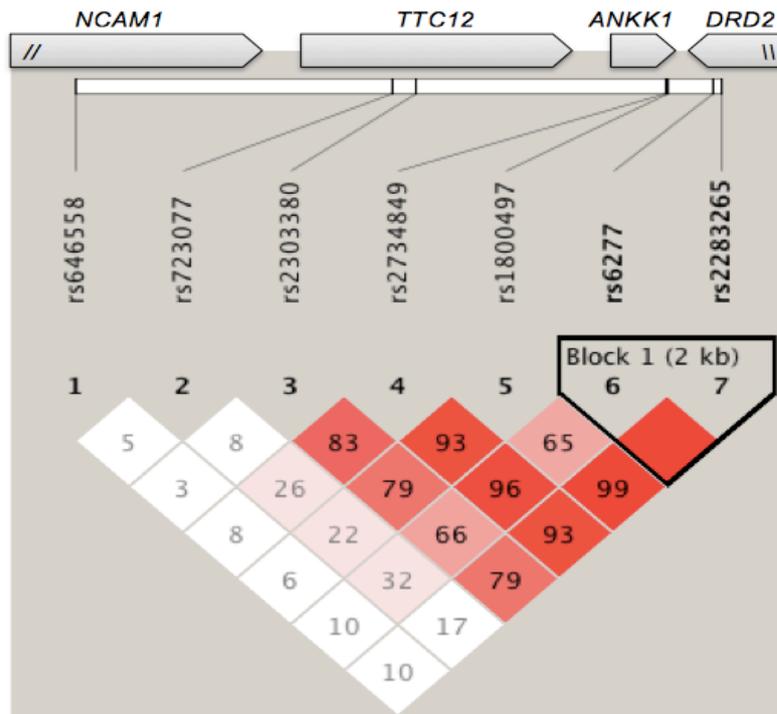


Figure 1. Linkage Disequilibrium (LD) patterns between the studied SNPs from the NTAD gene cluster in the total sample. The numbers in each box correspond to measured LD (D') among all possible pair of SNPs, which is also shown graphically according to the shade of red, where white represents very low D' and dark red represents very high D' .

Table 1. SNP characteristics and minor allele frequencies (MAF).

SNP (popular name)	Gene	Location	Alleles	MAF Total	MAF ADHD
rs646558	<i>NCAM1</i>	Intron 13	C/A	0.211(A)	0.2053(A)
rs723077	<i>TTC12</i>	Exon 3 (M73L)	A/C	0.479(C)	0.4844(C)
rs2303380	<i>TTC12</i>	Intron 7	A/G	0.362(G)	0.3515(G)
rs2734849	<i>ANKK1</i>	Exon 8 (H490R)	G/A	0.493(G)*	0.4913(A)*
rs1800497 (Taq1A)	<i>ANKK1</i>	Exon 8 (E713K)	C/T	0.211(T)	0.1981 (T)
rs6277 (C957T)	<i>DRD2</i>	Exon 7	T/C	0.467(C)	0.4621 (C)
rs2283265	<i>DRD2</i>	Intron 5	G/T	0.160(T)	0.1445 (T)

MAF Total and MAF ADHD correspond to the minor allele frequency computed in the total and ADHD-only samples, respectively.

*Note that the rs2734849 minor frequency allele is different in the total sample and in the ADHD-only sample. In order to use the same reference allele for all analyses, the effect of the A allele was chosen for evaluation.

Table 2. Logistic Regression Analyses of individual SNPs with ADHD and with common comorbidities within ADHD patients.

SNP	Gene	Allele	ADHD (n=520) vs. Controls (n=630)		Comorbidities within the ADHD sample											
			OR (CI95%)	P	Major Depressive Disorder (n=190)		Bipolar Disorder (n=83)		Generalized Anxiety Disorder (n=109)		Alcohol Abuse/Dependence (n=73)		Nicotine Dependence (n=224)		Conduct Disorder/Antisocial Personality (n=97)	
rs646558	<i>NCAM1</i>	A	1.02 (0.82-1.26)	0.887	0.61 (0.43-0.86)	0.005^a	1.42 (0.95-2.12)	0.084	0.84 (0.57-1.24)	0.385	0.72 (0.44-1.18)	0.194	0.98 (0.72- 1.35)	0.927	1.38 (0.93-2.04)	0.1067
rs723077	<i>TTC12</i>	C	1 (0.84-1.18)	0.985	0.96 (0.75-1.24)	0.777	1.15 (0.83-1.59)	0.413	1.28 (0.95- 1.73)	0.107	1.00 (0.70-1.42)	0.996	1.22 (0.95-1.56)	0.121	1.05 (0.77-1.44)	0.7487
rs2303380	<i>TTC12</i>	G	0.91 (0.76-1.09)	0.297	1.16 (0.89-1.52)	0.280	1.11 (0.79-1.58)	0.547	1.20 (0.88-1.65)	0.255	0.91 (0.62-1.32)	0.606	0.88 (0.67-1.15)	0.344	0.99 (0.71-1.39)	0.9675
rs2734849	<i>ANKK1</i>	A	0.90 (0.76-1.06)	0.208	1.13 (0.87-1.47)	0.368	1.01 (0.72-1.41)	0.979	1.06 (0.78-1.44)	0.724	1 (0.69-1.44)	0.997	0.90 (0.70-1.17)	0.434	0.92 (0.66-1.27)	0.6155
rs1800497	<i>ANKK1</i>	T	0.87 (0.70-1.07)	0.189	1.46 (1.05-2.03)	0.025^b	1.07 (0.70-1.65)	0.742	1.51 (1.03-2.20)	0.034^d	1.12 (0.72-1.76)	0.608	1.09 (0.79-1.51)	0.605	1.17 (0.78-1.75)	0.4418
rs6277	<i>DRD2</i>	C	0.97 (0.82-1.15)	0.715	1.26 (0.97-1.64)	0.081	0.89 (0.63-1.25)	0.486	1.07 (0.79-1.45)	0.681	0.96 (0.66-1.38)	0.808	0.94 (0.72-1.21)	0.605	0.93 (0.67-1.29)	0.6659
rs2283265	<i>DRD2</i>	T	0.80 (0.63-1.02)	0.070	1.72 (1.18-2.50)	0.005^c	0.63 (0.37-1.10)	0.103	1.46 (0.95-2.24)	0.083	1.20 (0.72-1.97)	0.484	1.22 (0.85-1.77)	0.283	1.07 (0.68-1.70)	0.7646

All logistic regression analyses were performed using sex and age as covariates and P-values shown correspond to the uncorrected asymptotic P-value obtained. P<0.05 are shown in bold. Subsequently, 10,000 permutation procedure was used to generate an empirical P-value corrected for the multiple SNPs tested (P_{corr}).

^a P_{corr} =**0.032**.

^b P_{corr} =0.132;

^c P_{corr} =**0.023**;

^d P_{corr} =0.170;

Table 3. Linear regression analyses of individual SNPs with temperament dimensions within ADHD adult patients.

SNP	Allele	Harm Avoidance		Novelty Seeking		Reward Dependence		Persistence	
		B ±(S.E.)	P	B ± (S.E.)	P	B ± (S.E.)	P	B ± (S.E.)	P
rs646558	A	-0.60 ± (0.55)	0.278	0.23 ± (0.49)	0.646	-0.24 ± (0.32)	0.461	-0.08 ± (0.15)	0.591
rs723077	C	-0.35± (0.43)	0.416	0.24 ± (0.39)	0.531	0.13± (0.25)	0.595	0.06 ± (0.12)	0.616
rs2303380	G	0.68 ± (0.46)	0.139	-0.17 ± (0.41)	0.691	-0.03 ± (0.27)	0.912	-0.04 ± (0.13)	0.768
rs2734849	A	0.99 ± (0.44)	0.025^a	0.25 ± (0.40)	0.538	0.12 ± (0.26)	0.651	-0.13 ± (0.12)	0.298
rs1800497	T	1.46 ± (0.56)	0.009^b	0.56 ± (0.51)	0.266	-0.13 ± (0.33)	0.697	-0.33 ± (0.15)	0.029^e
rs6277	C	1.13 ± (0.44)	0.010^c	0.39 ± (0.40)	0.323	0.06 ± (0.26)	0.815	-0.19 ± (0.12)	0.107
rs2283265	T	1.96 ± (0.63)	0.002^d	0.47 ± (0.58)	0.415	-0.30 ± (0.37)	0.418	-0.53 ± (0.17)	0.002^f

All linear regression analyses were performed using sex and age as covariates and the P-values shown correspond to the asymptotic P-value obtained. P<0.05 are shown in bold and P>0.1 are underlined. Subsequently, 10,000 permutation procedure was used to generate an empirical P-value corrected for the multiple SNPs tested (P_{corr}).

^a P_{corr} = 0.136.

^b P_{corr} = 0.056.

^c P_{corr} = 0.059.

^d P_{corr} = **0.013**.

^e P_{corr} = 0.153.

^f P_{corr} = **0.014**.

Table 4. Summary results of individual haplotype analyses in ADHD and comorbid Major Depressive and Generalized Anxiety Disorders.

	NCAM1 rs646558	TTC12 rs723077	TTC12 rs2303380	ANKK1 rs2734849	ANKK1 rs1800497	DRD2 rs6277	DRD2 rs2283265	Freq affected	Freq unaffected	Overall Freq	OR	Stat	P _{ind}	P _{gl}	P _{glcorr}
ADHD vs. Controls				A	T	C	T	0.139	0.170	0.155	0.77	4.48	0.034	0.035	0.170
Major Depressive Disorder	A	C						0.080	0.115	0.101	0.53	5.50	0.019	0.043	0.211
						C	T	0.177	0.126	0.145	1.72	7.91	0.005*	0.017	0.094
	C	C	G					0.137	0.099	0.113	1.85	7.06	0.008	0.029	0.147
	A	C	A					0.056	0.081	0.071	0.47	4.76	0.029	0.029	0.147
				A	T	C		0.192	0.139	0.155	1.59	6.26	0.012*	0.040	0.198
			A	T	C	T	0.172	0.121	0.136	1.66	6.68	0.010*	0.055	0.253	
Generalized Anxiety Disorder		C	G	A	T			0.130	0.090	0.096	1.78	4.69	0.030	0.049	0.215
		C	G	A	T	C		0.117	0.068	0.076	2.28	8.05	0.005*	0.032	0.144
		C	G	A	T	C	T	0.112	0.070	0.075	2.01	5.89	0.015	0.048	0.212

All logistic regression analyses were performed using sex and age as covariates and the P-values shown correspond to the asymptotic P-value obtained for individual haplotypes (P_{ind}). P_{gl} is the P-value that corresponds to the Omnibus test of the global haplotype analyses and the P_{glcorr} corresponds to its corrected value after accounting for multiple testing. P-values that were significant after correction for multiple testing are shown in bold.

*Significant after Bonferroni correction.

Table 5. Summary results of haplotype analyses showing individual haplotypes associated with Harm Avoidance and Persistence temperament dimensions among patients with ADHD.

	rs646558	rs723077	rs2303380	rs2734849	rs1800497	rs6277	rs2283265	Freq	B	Stat	P _{ind}	P _{gl}	P _{glcorr}
Harm Avoidance			A	T				0.185	1.37	5.47	0.020	0.023	0.365
			G	C				0.496	-1.13	6.53	0.011*	0.023	0.365
				T	C			0.164	1.93	9.86	0.002*	0.010	<u>0.077</u>
				C	T			0.504	-1.10	6.04	0.014*	0.010	<u>0.077</u>
					C	T		0.145	1.96	9.59	0.002*	0.003	0.026
						T	G	0.538	-1.13	6.58	0.011*	0.003	0.026
			A	T	C			0.155	1.60	6.85	0.009*	0.017	0.130
			G	C	T			0.496	-1.12	6.41	0.012*	0.017	0.130
				T	C	T		0.143	1.95	9.51	0.002*	0.019	0.146
				C	T	G		0.505	-1.08	5.85	0.016*	0.019	0.146
			A	T	C	T		0.136	1.88	8.45	0.004*	0.015	0.119
			G	C	T	G		0.496	-1.12	6.4	0.012*	0.015	0.119
			G	A	T	C	T	0.125	1.62	5.84	0.016	0.038	0.248
		A	G	C	T	G	0.464	-0.94	4.51	0.034	0.038	0.248	
Persistence				T	C			0.164	-0.45	7.3	0.007*	0.050	0.296
					C	T		0.145	-0.53	9.49	0.002*	0.008	<u>0.083</u>
				T	C	T		0.143	-0.50	8.25	0.004*	0.039	0.244

All linear regression analyses were performed using sex and age as covariates and the P-values shown correspond to the asymptotic P-value obtained for individual haplotypes (P_{ind}). P_{gl} is the P-value that corresponds to the Omnibus test of the global haplotype analyses and the P_{glcorr} corresponds to its corrected value after accounting for multiple testing. P-values that were significant after correction for multiple testing are shown in bold.

*Significant after Bonferroni correction.

Supplementary Table 1. Global haplotype analyses of the effect of the NTAD gene cluster SNPs on a) ADHD and on b) most frequent comorbidities and c) temperament traits within the ADHD sample.

a)

NSNP	NHap	Haplotypes		STAT	P _{gl}
		SNP1	SNP2		
2	4	rs646558	rs723077	0.89	0.827
2	4	rs723077	rs2303380	3.34	0.343
2	4	rs2303380	rs2734849	3.5	0.32
2	3	rs2734849	rs1800497	1.9	0.387
2	4	rs1800497	rs6277	2.1	0.551
2	3	rs6277	rs2283265	3.72	0.156
3	8	rs646558	rs2303380	5.87	0.555
3	8	rs723077	rs2734849	10.1	0.185
3	6	rs2303380	rs1800497	3.32	0.651
3	5	rs2734849	rs6277	3.08	0.544
3	5	rs1800497	rs2283265	9.72	0.045
4	12	rs646558	rs2734849	18.8	<u>0.065</u>
4	11	rs723077	rs1800497	9.02	0.53
4	7	rs2303380	rs6277	4.85	0.563
4	6	rs2734849	rs2283265	12	0.035
5	16	rs646558	rs1800497	22.2	0.103
5	12	rs723077	rs6277	11.4	0.412
5	7	rs2303380	rs2283265	8.16	0.226
6	17	rs646558	rs6277	24.5	<u>0.080</u>
6	12	rs723077	rs2283265	13.5	0.261
7	16	rs646558	rs2283265	21	0.138

The ADHD sample comprised 520 adults diagnosed with ADHD and the control sample comprised 630 non-ADHD adults. NSNP: Number of SNPs (haplotype window size); NHap: Number of individual haplotypes in that window; SNP1 and SNP2 refer to the first and last SNPs of the haplotype window, respectively. P_{gl} corresponds to the Omnibus P-value from the global haplotype analyses.

b)

				Comorbidities within the ADHD sample (n=520)					
Haplotypes				Major Depressive Disorder (n=190)		Bipolar Disorder (n=83)		Generalized Anxiety Disorder (n=109)	
NSNP	NHap	SNP1	SNP2	STAT	P _{gl}	STAT	P _{gl}	STAT	P _{gl}
2	4	rs646558	rs723077	8.17	0.043	3.99	0.263	3.98	0.264
2	4	rs723077	rs2303380	7.19	<u>0.066</u>	4.23	0.238	6.43	<u>0.093</u>
2	4	rs2303380	rs2734849	3.02	0.389	0.78	0.854	1.62	0.654
2	4	rs2734849	rs1800497	5.75	0.124	0.37	0.946	6.03	0.110
2	4	rs1800497	rs6277	6.27	<u>0.099</u>	1.75	0.626	6.39	<u>0.094</u>
2	3	rs6277	rs2283265	8.19	0.017	2.66	0.265	3.19	0.203
3	8	rs646558	rs2303380	15.6	0.029	10.8	0.148	8.65	0.279
3	8	rs723077	rs2734849	6.86	0.444	6.43	0.49	8.95	0.256
3	6	rs2303380	rs1800497	6.03	0.304	1.7	0.889	7.58	0.181
3	4	rs2734849	rs6277	8.33	0.040	3.46	0.326	6.22	0.101
3	5	rs1800497	rs2283265	8.46	<u>0.076</u>	10.6	0.032	6.21	0.184
4	14	rs646558	rs2734849	15.1	0.300	13.1	0.438	11.2	0.597
4	11	rs723077	rs1800497	8.39	0.591	9.69	0.468	18.4	0.049
4	7	rs2303380	rs6277	8.62	0.196	4.71	0.581	8.2	0.224
4	5	rs2734849	rs2283265	9.26	<u>0.055</u>	9.75	0.045	6.07	0.194
5	16	rs646558	rs1800497	15.8	0.397	16.9	0.324	17.9	0.269
5	13	rs723077	rs6277	11	0.528	11.8	0.462	22.6	0.032
5	7	rs2303380	rs2283265	9.6	0.143	5.56	0.475	7.07	0.314
6	18	rs646558	rs6277	18.3	0.368	18.7	0.348	27.1	<u>0.057</u>
6	12	rs723077	rs2283265	10.2	0.517	11.6	0.398	19.8	0.048
7	17	rs646558	rs2283265	16.6	0.412	18.7	0.286	20.1	0.217

Cont.

Haplotypes				Alcohol Abuse/ Dependence (n=73)		Nicotine Dependence (n=224)		Conduct Disorder/ Antisocial Personality Disorder (n=97)	
NSNP	NHap	SNP1	SNP2	STAT	P _{gl}	STAT	P _{gl}	STAT	P _{gl}
2	4	rs646558	rs723077	1.78	0.620	2.16	0.539	3.48	0.323
2	4	rs723077	rs2303380	0.36	0.948	3.84	0.279	2.37	0.500
2	4	rs2303380	rs2734849	0.45	0.931	1.41	0.704	0.35	0.951
2	4	rs2734849	rs1800497	1.08	0.782	3.38	0.337	1.93	0.587
2	4	rs1800497	rs6277	0.57	0.904	3.59	0.309	1.68	0.641
2	3	rs6277	rs2283265	0.87	0.647	2.43	0.296	0.47	0.789
3	8	rs646558	rs2303380	2.6	0.920	4.84	0.679	6.66	0.465
3	8	rs723077	rs2734849	3.18	0.868	4.77	0.688	6.14	0.524
3	6	rs2303380	rs1800497	2.31	0.805	3.09	0.686	3.59	0.610
3	4	rs2734849	rs6277	0.40	0.939	2.49	0.477	1.27	0.736
3	5	rs1800497	rs2283265	0.73	0.947	5.61	0.230	3.02	0.554
4	14	rs646558	rs2734849	6.34	0.933	8.05	0.841	14.1	0.368
4	11	rs723077	rs1800497	8.11	0.618	5.76	0.835	16.5	<u>0.087</u>
4	7	rs2303380	rs6277	2.23	0.898	4.07	0.667	3.01	0.807
4	5	rs2734849	rs2283265	1.03	0.905	3.86	0.425	1.88	0.758
5	16	rs646558	rs1800497	13.1	0.596	10.4	0.791	16.1	0.378
5	13	rs723077	rs6277	13.0	0.368	7.76	0.803	15.7	0.206
5	7	rs2303380	rs2283265	1.94	0.925	3.65	0.724	2.73	0.842
6	18	rs646558	rs6277	18.2	0.375	14.4	0.641	15.5	0.563
6	12	rs723077	rs2283265	12.0	0.365	5.78	0.888	15.2	0.175
7	17	rs646558	rs2283265	10.3	0.851	13.4	0.646	14.1	0.588

NSNP: Number of SNPs (haplotype window size); NHap: Number of individual haplotypes in that window; SNP1 and SNP2 refers to the first and last SNPs of the haplotype window, respectively. P_{gl} corresponds to the Omnibus P-value from the global haplotype analyses.

c)

Temperament Traits within the ADHD sample (n=520)											
Haplotypes				Harm Avoidance		Novelty Seeking		Reward Dependence		Persistence	
NSNP	NHap	SNP1	SNP2	STAT	P _{gl}	STAT	P _{gl}	STAT	P _{gl}	STAT	P _{gl}
2	4	rs646558	rs723077	1.95	0.582	0.63	0.890	0.87	0.834	2.19	0.534
2	4	rs723077	rs2303380	3.55	0.314	0.85	0.839	0.71	0.871	0.54	0.909
2	4	rs2303380	rs2734849	5.07	0.167	2.35	0.504	0.56	0.906	3.20	0.361
2	4	rs2734849	rs1800497	9.56	0.023	3.28	0.351	1.00	0.800	4.96	0.175
2	4	rs1800497	rs6277	11.4	0.010	4.71	0.194	0.67	0.880	7.81	<u>0.050</u>
2	3	rs6277	rs2283265	11.4	0.003	1.12	0.570	1.09	0.580	9.58	0.008
3	8	rs646558	rs2303380	5.02	0.658	2.51	0.926	2.49	0.928	4.08	0.770
3	8	rs723077	rs2734849	6.47	0.486	5.81	0.562	3.88	0.793	4.61	0.708
3	6	rs2303380	rs1800497	10.6	0.060	3.34	0.647	3.19	0.671	8.00	0.156
3	4	rs2734849	rs6277	10.3	0.017	1.78	0.618	1.36	0.716	6.63	<u>0.085</u>
3	5	rs1800497	rs2283265	11.8	0.019	6.12	0.190	2.59	0.629	10.1	0.039
4	14	rs646558	rs2734849	9.62	0.725	9.29	0.751	6.41	0.930	10.2	0.675
4	11	rs723077	rs1800497	12.2	0.270	9.16	0.517	4.26	0.935	9.64	0.472
4	7	rs2303380	rs6277	11.7	0.068	4.40	0.623	3.95	0.683	10.3	0.113
4	5	rs2734849	rs2283265	12.3	0.015	4.38	0.358	0.96	0.916	6.76	0.149
5	16	rs646558	rs1800497	12.8	0.620	10.6	0.781	7.59	0.939	14.4	0.492
5	13	rs723077	rs6277	15.2	0.231	8.79	0.721	4.66	0.968	15.0	0.243
5	7	rs2303380	rs2283265	13.4	0.038	2.89	0.823	2.28	0.892	11.2	<u>0.082</u>
6	18	rs646558	rs6277	20.2	0.263	13.2	0.719	9.01	0.940	20.5	0.248
6	12	rs723077	rs2283265	14.6	0.201	6.92	0.805	4.91	0.935	12.9	0.300
7	17	rs646558	rs2283265	20.1	0.215	11.7	0.765	9.73	0.880	18.8	0.278

NSNP: Number of SNPs (haplotype window size); NHap: Number of individual haplotypes in that window; SNP1 and SNP2 refers to the first and last SNPs of the haplotype window, respectively. P_{gl} corresponds to the Omnibus P-value from the global haplotype analyses.

7

Capítulo 7

DISCUSSÃO GERAL

“Todo argumento permite sempre a discussão de duas teses contrárias, inclusive este de que a tese favorável e contrária são igualmente defensáveis”

Protágoras (480-411 a.C.)

- Contextualização: O momento atual da psiquiatria e genética psiquiátrica

Estamos vivendo um momento inusitado na área da psiquiatria. Já era esperado que ano de 2013 ficasse marcado pelo lançamento da 5ª Edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5) pela Associação Americana de Psiquiatria (APA), com todas as suas esperadas e/ou temidas alterações na classificação e nos critérios para diagnóstico dos transtornos psiquiátricos em relação ao atual DSM-IV, publicado em 1994. No entanto, o que não era esperado é que poucas semanas antes do lançamento do DSM-5, o Instituto Nacional de Saúde Mental (NIMH, do inglês *National Institute of Mental Health*) – instituição norte-americana que corresponde ao maior instituto de saúde mental e de apoio financeiro à pesquisa no mundo – informou que estaria retirando seu apoio a futuros projetos baseados no DSM-5.

Por meio de sua página no site do NIMH, o Diretor Thomas Insel fez críticas ao (futuro) DSM-5 afirmando que o que é descrito como a “Bíblia” na psiquiatria não passa de, no máximo, um dicionário e se por um lado o ponto forte das edições do DSM é sua consistência – que faz com que os mesmos termos sejam usados segundo os mesmos critérios – por outro lado, seu ponto fraco é a falta de fundamentação dos diagnósticos baseados em um consenso sobre grupos de sintomas cínicos. Ele então chama a atenção para o projeto lançado pelo NIMH, intitulado RDoC (do inglês *Research Domain Criteria*), o qual pretende transformar o processo de diagnóstico ao incorporar informações genéticas, de neuroimagem, de cognição, entre outras, como base para a fundação de um novo sistema de classificação. No entanto, estas informações ainda são escassas e as pesquisas devem ser direcionadas para a obtenção de tais marcadores. Ele sugere ainda que não é possível obter sucesso nessa nova abordagem se as categorias do DSM continuarem a ser usadas como “padrão ouro”.

O motivo pelo qual esse assunto está sendo tratado na discussão da presente Tese deve-se ao fato de que vivemos um momento único nessa área de pesquisa em que se clama por inovações e as abordagens implementadas nos estudos desenvolvidos ao longo desse doutorado podem ter algo a contribuir para este debate. Talvez seja realmente a hora de avaliarmos como têm sido

conduzidas as pesquisas genéticas na área da psiquiatria até o momento e darmos um passo à frente, ou melhor ainda, pensarmos na possibilidade de alterar um pouco o ângulo da nossa caminhada na tentativa de avançar rumo a esses objetivos maiores.

- Efeitos Epistáticos: Papel na compreensão de inconsistências da literatura e na herdabilidade perdida/fantasma

Nos estudos referentes aos Capítulos 2 (Mota et al., 2013) e 3 (Mota et al., *in press*) da presente Tese fomos além da abordagem tradicional dos estudos de associação genética e utilizamos evidências *a priori* para investigar efeitos epistáticos envolvidos em transtornos psiquiátricos. Com base em evidências de que os receptores dopaminérgicos D2 e D4 são capazes de formar heterômeros e que a eficiência desse processo depende das isoformas envolvidas (Borrito-Escuela et al., 2011; González et al., 2012), testamos a hipótese de que interações entre *DRD2* e *DRD4* estariam modulando o efeito desses receptores na predisposição ao desenvolvimento do Transtorno por Uso de Álcool e do TC em crianças com TDAH, o que ajudaria a explicar a inconsistência entre os resultados dos muitos estudos que vinham avaliando só um dos genes isoladamente.

Em um primeiro momento, nós observamos efeitos epistáticos (refletido por interações estatísticas significativas) entre polimorfismos dos genes *DRD2* (rs2283265) e *DRD4* (48-pb VNTR), os quais acredita-se refletir as isoformas envolvidas no processo de heteromerização, na susceptibilidade ao Transtorno por Uso de Álcool em duas amostras independentes (adultos com e sem TDAH) (Mota et al., 2013).

Em seguida, foi possível identificar que esse efeito da interação epistática entre *DRD2* e *DRD4* podia ser detectado ainda na infância, influenciando no desenvolvimento do TC em crianças com TDAH (Mota et al., *in press*). Este resultado se soma às evidências de que fatores genéticos que conferem susceptibilidade a transtornos psiquiátricos podem se manifestar de diferentes formas ao longo do desenvolvimento.

Esses resultados combinados criam um cenário altamente promissor uma vez que o efeito dessa interação entre *DRD2* e *DRD4* na predisposição a transtornos externalizantes foi observado em três amostras independentes. Isso só foi possível pela incorporação de informações de outras áreas de pesquisa (bioquímica, fisiologia, por exemplo) na elaboração de hipóteses prévias para a investigação de efeitos epistáticos. Além disso, a implicação de um papel dessa interação gênica na susceptibilidade ao TC em crianças/adolescentes, o qual é um frequente precursor de subseqüentes problemas relacionados ao uso de álcool, sugere um mecanismo potencial para explicar uma via causal entre TC na infância e o desenvolvimento de Transtorno por Uso de Álcool na vida adulta.

Como descrito no Capítulo introdutório, o interesse e o reconhecimento da importância de interações gênicas nas diversas áreas da genética humana vêm de fato aumentando consideravelmente nos últimos anos. Em tempos atuais de ampla disponibilidade de dados de GWAS, testar todas as interações possíveis entre os milhares/milhões de polimorfismos não parece ser a melhor saída. Assim, em concordância com o que vem sendo enfatizado na presente Tese, grande empenho vem sendo implementado no desenvolvimento de novas abordagens visando identificar efeitos epistáticos em dados de GWAS através da implementação de evidências prévias na seleção dos SNPs a serem testados (revisão em Ritchie, 2011; Liu et al., 2012; Nazarian et al., 2012).

Embora alguns indiquem que os tamanhos amostrais continuam demasiadamente pequenos para análises em larga escala, os primeiros resultados desse tipo de abordagem em GWAS começam a surgir com relativo sucesso, como por exemplo, no caso de Artrite Reumatóide (Nazarian et al., 2012), Doença de Crohn (Emily et al., 2009; Nazarian et al., 2012), Diabetes do Tipo-2 (Liu et al., 2012) e níveis de colesterol (Ma et al., 2012). No entanto, isso de forma alguma indica que os estudos de interações específicas (estilo gene-candidato) devem ser considerados ultrapassados; pelo contrário, na área da psiquiatria especialmente, onde os estudos envolvendo interações são mais raros e menos robustos e as grandes amostras ainda estão em fase de coleta, informações provindas de estudos de “interações-candidatas” poderiam inclusive

auxiliar no aperfeiçoamento dessas técnicas que utilizam evidências *a priori* na busca por efeitos epistáticos em dados de GWAS.

O Anexo I apresenta um artigo em formato de comentário, publicado na revista *Frontiers in Human Neuroscience*, sobre a abordagem da herdabilidade fantasma na área da psiquiatria através do estudo de interações gênicas baseadas em hipóteses prévias (Rovaris et al., 2013a). Em concordância com os estudos apresentados nos Capítulos 2 e 3 da presente Tese, é sugerido que investigações de efeitos epistáticos específicos com base em hipóteses fundamentadas em evidências *a priori*, apesar de tradicionalmente negligenciadas, devem ser cada vez mais aplicadas na área genética psiquiátrica (Rovaris et al., 2013a). O Anexo II apresenta achados adicionais do nosso grupo a respeito da influência de efeitos epistáticos na susceptibilidade à Dependência de Nicotina, publicados na revista *Journal of Neural Transmission* este ano (Rovaris et al., 2013b). Assim, estes resultados em conjunto enfatizam a necessidade de ir além da abordagem tradicional de associação “um polimorfismo – um fenótipo”, complementado os estudos com investigações de efeitos epistáticos, de preferência, envolvendo hipóteses de interações baseadas em evidências biológicas prévias.

-Complexo gênico NTAD: evolução e implicações fenotípicas

Além da importância de analisar interações gênicas, uma abordagem alternativa apresentada na presente Tese visa investigar, de modo conjunto, o papel de polimorfismo presentes ao longo de agrupamentos gênicos na manifestação de transtornos ou na modulação da variabilidade normal do comportamento. Dessa forma, ao invés de focar em um único gene, o estudo leva em consideração a vizinhança onde esse está localizado.

Além disso, uma vez que evidências sugerindo a existência de efeitos conjuntos e de inter-relações dos genes de um agrupamento, uma maior compreensão a respeito da formação e manutenção desse complexo gênico no decorrer da evolução torna-se necessária, ou ao menos, muito instigante.

-História evolutiva do NTAD

O Capítulo 4 apresenta estudo conduzido como intuito de investigar a história evolutiva do complexo NTAD através da análise comparativa do genoma de 48 espécies de vertebrados e também da comparação de um conjunto de sítios polimórficos entre primatas, incluindo *Homo neanderthalensis* (Green et al., 2010) e Denisovan (Reich et al., 2010).

Foi possível verificar que trata-se de um complexo bastante antigo, sendo que o agrupamento TAD, ou seja, *TTC12-ANKK1-DRD2*, pode ser encontrado apresentando sintonia e vizinhança conservadas desde os ramos mais basais investigados (peixes teleósteos), sendo datado em pelo menos ~525 milhões de anos, na origem dos vertebrados. Parece ser interessante o fato de que a aproximação do *NCAM1* a esse complexo já formado (TAD) tenha aparentemente coincidido com a saída dos vertebrados do meio aquático e a conquista do ambiente terrestre, datada em aproximadamente ~400 milhões de anos atrás.

Essa transição foi acompanhada por mudanças importantes do sistema nervoso central dos vertebrados e, visto que está sendo mantida conservada até hoje, pode-se cogitar que a aproximação desses genes relacionados a desenvolvimento neuronal e/ou neurotransmissão possa ter tido/estar tendo um papel fundamental para o funcionamento desse sistema nervoso mais complexo.

Nós encontramos também evidências de que os genes do complexo NTAD sejam co-regulados, o que está de acordo com estudos genômicos que sugerem uma tendência de genes co-regulados, co-expressos e/ou co-funcionais localizarem-se mais proximamente ao longo dos cromossomos (Cohen et al., 2000; Hurst et al., 2004; Sémon e Duret 2006; Janga et al., 2008; Michalak 2008; Arnone et al., 2012). Assim, é possível sugerir que o surgimento desse mecanismo de co-regulação do NTAD represente uma adaptação funcional importante no momento em que o sistema nervoso central dos vertebrados tornou-se mais complexo.

Além disso, verificamos que alguns polimorfismos do NTAD (incluindo o Taq1A) provavelmente estavam presentes nos genomas de outras espécies do gênero *Homo* além de *H. Sapiens*. Esse achado sugere a possibilidade de que

processos de seleção ou deriva genética possam ter agido/agir nesses sítios resultando na manutenção de ambos alelos por um longo período de tempo.

Esses resultados combinados reforçam ainda mais as evidências da implicação de genes/polimorfismos do agrupamento NTAD na modulação de fenótipos importantes para o desenvolvimento/sobrevivência tanto de nós humanos como de outras espécies de vertebrados.

-O complexo gênico NTAD e a heterogeneidade do TDAH

No Capítulo 5 é descrito um estudo avaliando o papel de variações genéticas ao longo do complexo NTAD na predisposição e modulação da apresentação clínica do TDAH, visando melhor compreender os fatores os achados inconsistentes na literatura envolvendo o tradicional polimorfismo Taq1A.

Os resultados indicam que variações genéticas do NTAD, não restritas ao Taq1A, são capazes de modular a manifestação clínica do TDAH através da associação com comorbidades e traços de temperamento. Polimorfismos individuais e/ou haplótipos centrados na região *ANKK1/DRD2* foram associados com características internalizantes em indivíduos com TDAH, como os Transtornos Depressivo Maior e de Ansiedade Generalizada e com escores elevados de Evitação de Dano e reduzidos de Persistência. Além disso, a susceptibilidade ao Transtorno Depressivo Maior parece ser influenciada independentemente por polimorfismos nos genes *NCAM1* e *DRD2*. A presença de múltiplos fatores de risco no NTAD ressalta a complexidade dos efeitos do NTAD e reforça a sugestão prévia de que os quatro genes desse agrupamento devem ter funções relacionadas na modulação comportamental, embora a maneira pela qual isso ocorre ainda não está esclarecida (Yang et al., 2007).

Com base em estudos funcionais prévios dos polimorfismos associados, foi possível sugerir que uma das maneiras pela qual os genes dos NTAD poderiam estar influenciando a susceptibilidade tanto de transtornos/características internalizantes (Capítulo 5) como externalizantes (Gelernter et al., 2006; Yang et al., 2007; 2008; Ducci et al., 2010; Nelson et al., 2013) poderia ser através da desregulação da transmissão dopaminérgica no cérebro. Além disso, uma

hipótese que pode ser levantada é de que esse efeito de variantes do NTAD na predisposição geral a transtornos externalizantes e internalizantes (possivelmente devido a um estado hipodopaminérgico) possa ser mediada/explicada, em parte, pela associação encontrada dessas variantes com escores elevados de Evitação de Dano. Essa hipótese requer que investigações adicionais sejam conduzidas em amostras independentes, tanto em indivíduos com TDAH (visando replicação dos achados atuais) como sem TDAH, para testar sua validade.

De modo geral, os achados apresentados no Capítulo 5 podem ajudar a elucidar inconsistências prévias da literatura a respeito da associação de polimorfismo Taq1A com o TDAH e outros transtornos. Ao mesmo tempo em que os resultados apresentados contribuem para o conhecimento acerca dos efeitos do agrupamento gênico NTAD em transtornos psiquiátricos, eles acrescentam uma ainda maior complexidade a esse panorama. No entanto, justamente essa grande complexidade dos efeitos do NTAD, possivelmente envolvendo 1) efeitos de múltiplos polimorfismos, 2) efeitos pleiotrópicos e 3) dimensões de personalidades compartilhadas dos diversos transtornos, sugere possíveis fontes para as significativas heterogeneidades consistentemente descritas por meta-análises do TAq1A com TDAH (Gizer et al., 2009; Wu et al., 2012), Transtorno por Uso de Álcool (Munafò et al. 2007, Smith et al. 2008, Le Foll et al., 2009 e Wang et al. 2013) e Nicotina (Li et al., 2004; Munafò et al., 2004, 2009).

Por serem transtornos psiquiátricos de herança complexa, é esperado que múltiplos genes espalhados pelo genoma contribuam para a susceptibilidade a esses transtornos. No entanto, é possível que as inconsistências nos achados com o Taq1A reflitam a presença de forte heterogeneidade genética dentro do próprio NTAD, envolvendo polimorfismos em maior ou menor grau de desequilíbrio de ligação. Esses, por sua vez, podem conferir efeitos aditivos ou mesmo estar interagindo com outros polimorfismos da mesma região ou regiões distintas do genoma (como descrito nos Capítulos 2 (Mota et al., 2013) e 3 (Mota et al., *in press*), por exemplo). Além disso, é possível que variações nas taxas de comorbidades e/ou de dimensões de personalidade entre amostras distintas possam contribuir para inconsistências entre estudos. Uma apresentação clínica marcada pela presença de comorbidades (tanto internalizantes como

externalizantes) poderia refletir um perfil genético e funcional com mais alterações.

Provavelmente os achados mais consistentes e promissores apresentados na presente Tese (descritos nos Capítulos 2 (Mota et al., 2013), 3 (Mota et al., *in press*) e no Anexo I (Rovaris et al., 2013)) referem-se a importância da investigação de efeitos epistáticos na modulação comportamental e o aproveitamento de evidências bioquímicas, fisiológicas e/ou estatísticas por exemplo, na elaboração de hipótese *a priori* para testar tais interações. Além disso, com base nos resultados apresentados no Capítulo 5, apoiado também pelo estudo referente ao Capítulo 4 (Mota et al., 2013), é sugerido que para uma maior compreensão do papel do receptor de dopamina D2 na psiquiatria os futuros estudos não fiquem restritos a investigar a associação direta entre o tradicional polimorfismo Taq1A e um transtorno específico. Se faz necessário que estas investigações sejam expandidas a fim de englobar outros polimorfismos espalhados ao longo do complexo gênico NTAD, os quais podem apresentar efeitos independentes sobre o mesmo fenótipo, além de efeitos pleiotrópicos. Isso ressalta também a importância de um maior refinamento fenotípico, considerando padrões de comorbidades e traços de personalidade.

*“Closing time, open all the doors
And let you out into the world
Closing time, turn all of the lights on
Over every boy and every girl
Closing time, one last call for alcohol
So finish your whiskey or beer
Closing time, you don't have to go home
But you can't stay here
...
Closing time, time for you to go out
To the places you will be from
...
Closing time, every new beginning
Comes from some other beginning's end”*

(Closing Time, Semisonic)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta, M. T., Castellanos, F. X., Bolton, K. L., Balog, J. Z., Eagen, P., Nee, L., Jones, J., Palacio, L., Sarampote, C., Russell, H. F., et al. (2008). Latent class subtyping of attention-deficit/hyperactivity disorder and comorbid conditions. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry* 47, 797–807.

Agrawal, A., and Lynskey, M. T. (2008). Are there genetic influences on addiction: evidence from family, adoption and twin studies. *Addiction* 103, 1069–1081.

Ahlbom, A., and Alfredsson, L. (2005). Interaction: A word with two meanings creates confusion. *Eur. J. Epidemiol.* 20, 563–564.

American Psychiatric Association (1994). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. (4th ed.). Washington DC.

American Psychiatric Association (2002). *DSM-IV-TR Manual Diagnóstico e estatístico de Transtornos Mentais*. 4ª edição. Texto revisado. Porto Alegre: Artmed.

Ambrósio, A. M., Kennedy, J. L., Macciardi, F., Macedo, A., Valente, J., Dourado, A., Oliveira, C. R., and Pato, C. (2004). Family association study between DRD2 and DRD3 gene polymorphisms and schizophrenia in a Portuguese population. *Psychiatry Research* 125, 185–191.

Anckarsäter, H., Stahlberg, O., Larson, T., Hakansson, C., Jutblad, S.-B., Niklasson, L., Nydén, A., Wentz, E., Westergren, S., Cloninger, C. R., et al. (2006). The impact of ADHD and autism spectrum disorders on temperament, character, and personality development. *Am J Psychiatry* 163, 1239–1244.

Angold, A., Costello, E. J., and Erkanli, A. (1999). Comorbidity. *J Child Psychol Psychiatry* 40, 57–87.

Aonurm-Helm, A., Jürgenson, M., Zharkovsky, T., Sonn, K., Berezin, V., Bock, E., and Zharkovsky, A. (2008). Depression-like behaviour in neural cell adhesion molecule (NCAM)-deficient mice and its reversal by an NCAM-derived peptide, FGL. *Eur. J. Neurosci.* 28, 1618–1628.

Arai, M., Itokawa, M., Yamada, K., Toyota, T., Arai, M., Haga, S., Ujike, H., Sora, I., Ikeda, K., and Yoshikawa, T. (2004). Association of neural cell adhesion

molecule 1 gene polymorphisms with bipolar affective disorder in Japanese individuals. *Biological Psychiatry* 55, 804–810.

Arcos-Burgos, M., Vélez, J. I., Solomon, B. D., and Muenke, M. (2012). A common genetic network underlies substance use disorders and disruptive or externalizing disorders. *Hum Genet* 131, 917–929.

Arnone, J. T., Robbins-Pianka, A., Arace, J. R., Kass-Gergi, S., and McAlear, M. A. (2012). The adjacent positioning of co-regulated gene pairs is widely conserved across eukaryotes. *BMC Genomics* 13, 546.

Asghari, V., Sanyal, S., Buchwaldt, S., Paterson, A., Jovanovic, V., and Van Tol, H. H. (1995). Modulation of intracellular cyclic AMP levels by different human dopamine D4 receptor variants. *J. Neurochem.* 65, 1157–1165.

Atz, M. E., Rollins, B., and Vawter, M. P. (2007). NCAM1 association study of bipolar disorder and schizophrenia: polymorphisms and alternatively spliced isoforms lead to similarities and differences. *Psychiatric Genetics* 17, 55–67.

Barkley, R. A., Fischer, M., Smallish, L., and Fletcher, K. (2006). Young adult outcome of hyperactive children: adaptive functioning in major life activities. *JAAC* 45, 192–202.

Barratt, D. T., Coller, J. K., and Somogyi, A. A. (2006). Association between the DRD2 A1 allele and response to methadone and buprenorphine maintenance treatments. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 141B, 323–331.

Barrett, J. C., Fry, B., Maller, J., and Daly, M. J. (2005). Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21, 263–265.

Beaver, K. M., Wright, J., DeLisi, M., Walsh, A., Vaughn, M. G., Boisvert, D., and Vaske, J. (2007). A gene × gene interaction between DRD2 and DRD4 is associated with conduct disorder and antisocial behavior in males. *Behav Brain Funct* 3, 30.

Berman, S., Ozkaragoz, T., Young, R. M., and Noble, E. P. (2002). D2 dopamine receptor gene polymorphism discriminates two kinds of novelty seeking. *Personality and Individual Differences* 33, 867–882.

Betcheva, E. T., Mushiroda, T., Takahashi, A., Kubo, M., Karachanak, S. K., Zaharieva, I. T., Vazharova, R. V., Dimova, I. I., Milanova, V. K., Tolev, T., et al. (2009). Case-control association study of 59 candidate genes reveals the DRD2 SNP rs6277 (C957T) as the only susceptibility factor for schizophrenia in the Bulgarian population. *J Hum Genet* 54, 98–107.

Biederman, J., Petty, C. R., Fried, R., Fontanella, J., Doyle, A. E., Seidman, L. J., and Faraone, S. V. (2007). Can self-reported behavioral scales assess executive function deficits? A controlled study of adults with ADHD. *The Journal of Nervous and Mental Disease* *195*, 240–246.

Biederman, J., Petty, C. R., Wilens, T. E., Fraire, M. G., Purcell, C. A., Mick, E., Monuteaux, M. C., and Faraone, S. V. (2008). Familial risk analyses of attention deficit hyperactivity disorder and substance use disorders. *Am J Psychiatry* *165*, 107–115.

Biederman, J., Faraone, S. V., Spencer, T. J., Mick, E., Monuteaux, M. C., and Aleardi, M. (2006). Functional impairments in adults with self-reports of diagnosed ADHD: A controlled study of 1001 adults in the community. *J Clin Psychiatry* *67*, 524–540.

Bierut, L. J., Agrawal, A., Bucholz, K. K., Doheny, K. F., Laurie, C., Pugh, E., Fisher, S., Fox, L., Howells, W., Bertelsen, S., et al. (2010). A genome-wide association study of alcohol dependence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *107*, 5082–5087.

Bisaz, R., and Sandi, C. (2012). Vulnerability of conditional NCAM-deficient mice to develop stress-induced behavioral alterations. *Stress* *15*, 195–206.

Blanco, C., Krueger, R. F., Hasin, D. S., Liu, S.-M., Wang, S., Kerridge, B. T., Saha, T., and Olfson, M. (2013). Mapping common psychiatric disorders: structure and predictive validity in the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions. *JAMA Psychiatry* *70*, 199–208.

Blum, K., Noble, E. P., Sheridan, P. J., Montgomery, A., Ritchie, T., Jagadeeswaran, P., Nogami, H., Briggs, A. H., and Cohn, J. B. (1990). Allelic association of human dopamine D2 receptor gene in alcoholism. *JAMA* *263*, 2055–2060.

Blum, K., Sheridan, P. J., Wood, R. C., Braverman, E. R., Chen, T. J., Cull, J. G., and Comings, D. E. (1996). The D2 dopamine receptor gene as a determinant of reward deficiency syndrome. *J R Soc Med* *89*, 396–400.

Bontempi, S., Fiorentini, C., Busi, C., Guerra, N., Spano, P., and Missale, C. (2007). Identification and characterization of two nuclear factor-kappaB sites in the regulatory region of the dopamine D2 receptor. *Endocrinology* *148*, 2563–2570.

Boomsma, D. I., Saviouk, V., Hottenga, J.-J., Distel, M. A., de Moor, M. H. M., Vink, J. M., Geels, L. M., van Beek, J. H. D. A., Bartels, M., de Geus, E. J. C.,

et al. (2010). Genetic epidemiology of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD index) in adults. *PLoS ONE* 5, e10621.

Borroto-Escuela, D. O., Van Craenenbroeck, K., Romero-Fernandez, W., Guidolin, D., Woods, A. S., Rivera, A., Haegeman, G., Agnati, L. F., Tarakanov, A. O., and Fuxe, K. (2011). Dopamine D2 and D4 receptor heteromerization and its allosteric receptor-receptor interactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404, 928–934.

Bowirrat, A., and Oscar-Berman, M. (2005). Relationship between dopaminergic neurotransmission, alcoholism, and Reward Deficiency syndrome. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 132B, 29–37.

Brook, D. W., Brook, J. S., Zhang, C., and Koppel, J. (2010). Association between attention-deficit/hyperactivity disorder in adolescence and substance use disorders in adulthood. *Arch Pediatr Adolesc Med* 164, 930–934.

Brook, J. S., Duan, T., Zhang, C., Cohen, P. R., and Brook, D. W. (2008). The association between attention deficit hyperactivity disorder in adolescence and smoking in adulthood. *Am J Addict* 17, 54–59.

Brückl, T. M., Wittchen, H.-U., Höfler, M., Pfister, H., Schneider, S., and Lieb, R. (2007). Childhood separation anxiety and the risk of subsequent psychopathology: Results from a community study. *Psychother Psychosom* 76, 47–56.

Burcusa et al 2003 Adolescent twins discordant for major depressive disorder- shared familial liability to externalizing and other internalizing disorders (2003). Burcusa et al 2003 Adolescent twins discordant for major depressive disorder- shared familial liability to externalizing and other internalizing disorders. 1–9.

Burcusa, S. L., Iacono, W. G., and McGue, M. (2003). Adolescent twins discordant for major depressive disorder: shared familial liability to externalizing and other internalizing disorders. *J Child Psychol Psychiatry* 44, 997–1005.

Castelo-Branco, G., and Arenas, E. (2006). Function of Wnts in dopaminergic neuron development. *Neurodegener Dis* 3, 5–11.

Castillo-Gómez, E., Gómez-Climent, M. Á., Varea, E., Guirado, R., Blasco-Ibáñez, J. M., Crespo, C., Martínez-Guijarro, F. J., and Nacher, J. (2008). Dopamine acting through D2 receptors modulates the expression of PSA-NCAM, a molecule related to neuronal structural plasticity, in the medial prefrontal cortex of adult rats. *Experimental Neurology* 214, 97–111.

Castillo-Gómez, E., Varea, E., Blasco-Ibáñez, J. M., Crespo, C., and Náchter, J. (2011). Polysialic Acid Is Required for Dopamine D2 Receptor-Mediated Plasticity Involving Inhibitory Circuits of the Rat Medial Prefrontal Cortex. *PLoS ONE* 6, e29516.

Chang, Z., Lichtenstein, P., Asherson, P. J., and Larsson, H. (2013). Developmental twin study of attention problems: high heritabilities throughout development. *JAMA Psychiatry* 70, 311–318.

Charach, A., Yeung, E., Climans, T., and Lillie, E. (2011). Childhood attention-deficit/hyperactivity disorder and future substance use disorders: comparative meta-analyses. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry* 50, 9–21.

Cloninger, C. R. (1987). A systematic method for clinical description and classification of personality variants. A proposal. *Arch. Gen. Psychiatry* 44, 573–588.

Cloninger, C. R., Svrakic, D. M., and Przybeck, T. R. (1993). A psychobiological model of temperament and character. *Arch. Gen. Psychiatry* 50, 975–990.

Cohen, B. A., Mitra, R. D., Hughes, J. D., and Church, G. M. (2000). A computational analysis of whole-genome expression data reveals chromosomal domains of gene expression. *Nat. Genet.* 26, 183–186.

Colzato, L. S., van den Wildenberg, W. P. M., Van der Does, A. J. W., and Hommel, B. (2010). Genetic markers of striatal dopamine predict individual differences in dysfunctional, but not functional impulsivity. *Neuroscience* 170, 782–788.

Colzato, L. S., van den Wildenberg, W. P. M., and Hommel, B. (2013). The genetic impact (C957T-DRD2) on inhibitory control is magnified by aging. *Neuropsychologia* 51, 1377–1381.

Comings, D. E., Wu, S., Chiu, C., Ring, R. H., Gade, R., Ahn, C., MacMurray, J. P., Dietz, G., and Muhleman, D. (1996). Polygenic inheritance of Tourette syndrome, stuttering, attention deficit hyperactivity, conduct, and oppositional defiant disorder: the additive and subtractive effect of the three dopaminergic genes--DRD2, D beta H, and DAT1. *Am. J. Med. Genet.* 67, 264–288.

Comings, D. E., Comings, B. G., Muhleman, D., Dietz, G., Shahbahrami, B., Tast, D., Knell, E., Kocsis, P., Baumgarten, R., and Kovacs, B. W. (1991). The

dopamine D2 receptor locus as a modifying gene in neuropsychiatric disorders. *JAMA* 266, 1793–1800.

Conner, B. T., Noble, E. P., Berman, S. M., Ozkaragoz, T., Ritchie, T., Antolin, T., and Sheen, C. (2005). DRD2 genotypes and substance use in adolescent children of alcoholics. *Drug and Alcohol Dependence* 79, 379–387.

Copeland, W. E., Adair, C. E., Smetanin, P., Stiff, D., Briante, C., Colman, I., Fergusson, D., Horwood, J., Poulton, R., Jane Costello, E., et al. (2013). Diagnostic transitions from childhood to adolescence to early adulthood. *J Child Psychol Psychiatry*.

Cosgrove, V. E., Rhee, S. H., Gelhorn, H. L., Boeldt, D., Corley, R. C., Ehringer, M. A., Young, S. E., and Hewitt, J. K. (2011). Structure and etiology of co-occurring internalizing and externalizing disorders in adolescents. *J Abnorm Child Psychol* 39, 109–123.

Costello, E. J., Mustillo, S., Erkanli, A., Keeler, G., and Angold, A. (2003). Prevalence and development of psychiatric disorders in childhood and adolescence. *Arch. Gen. Psychiatry* 60, 837–844.

Dalley, J. W., Fryer, T. D., Brichard, L., Robinson, E. S. J., Theobald, D. E. H., Lääne, K., Peña, Y., Murphy, E. R., Shah, Y., Probst, K., et al. (2007). Nucleus accumbens D2/3 receptors predict trait impulsivity and cocaine reinforcement. *Science* 315, 1267–1270.

David, S. P., Mezuk, B., Zandi, P. P., Strong, D., Anthony, J. C., Niaura, R., Uhl, G. R., and Eaton, W. W. (2010). Sex differences in TTC12/ANKK1 haplotype associations with daily tobacco smoking in Black and White Americans. *Nicotine & Tobacco Res.* 12, 251–262.

Davis, L. L., Frazier, E., Husain, M. M., Warden, D., Trivedi, M., Fava, M., Cassano, P., McGrath, P. J., Balasubramani, G. K., Wisniewski, S. R., et al. (2006). Substance use disorder comorbidity in major depressive disorder: a confirmatory analysis of the STAR*D cohort. *Am J Addict* 15, 278–285.

de Cerqueira, C. C. S., Polina, E. R., Contini, V., Marques, F. Z. C., Grevet, E. H., Salgado, C. A. I., da Silva, P. O. G., Picon, F. A., Belmonte-de-Abreu, P., and Bau, C. H. D. (2011). ADRA2A polymorphisms and ADHD in adults: possible mediating effect of personality. *Psychiatry Research* 186, 345–350.

de Almeida, J., and Mengod, G. (2010). D2 and D4 dopamine receptor mRNA distribution in pyramidal neurons and GABAergic subpopulations in

monkey prefrontal cortex: implications for schizophrenia treatment. *Neuroscience* 170, 1133–1139.

De Mei, C., Ramos, M., Iitaka, C., and Borrelli, E. (2009). Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *Current Opinion in Pharmacology* 9, 53–58.

Diana, M. (2011). The dopamine hypothesis of drug addiction and its potential therapeutic value. *Front Psychiatry* 2, 64.

Dichter, G. S., Damiano, C. A., and Allen, J. A. (2012). Reward circuitry dysfunction in psychiatric and neurodevelopmental disorders and genetic syndromes: animal models and clinical findings. *J Neurodev Disord* 4, 19.

Dick, D. M., Viken, R. J., Kaprio, J., Pulkkinen, L., and Rose, R. J. (2005). Understanding the covariation among childhood externalizing symptoms: genetic and environmental influences on conduct disorder, attention deficit hyperactivity disorder, and oppositional defiant disorder symptoms. *J Abnorm Child Psychol* 33, 219–229.

Disney, E. R., Elkins, I. J., McGue, M., and Iacono, W. G. (1999). Effects of ADHD, conduct disorder, and gender on substance use and abuse in adolescence. *Am J Psychiatry* 156, 1515–1521.

Downey, K. K., Stelson, F. W., Pomerleau, O. F., and Giordani, B. (1997). Adult attention deficit hyperactivity disorder: psychological test profiles in a clinical population. *The Journal of Nervous and Mental Disease* 185, 32–38.

Duan, J., Wainwright, M. S., Comeron, J. M., Saitou, N., Sanders, A. R., Gelernter, J., and Gejman, P. V. (2003). Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Human Molecular Genetics* 12, 205–216.

Dubertret, C., Bardel, C., Ramoz, N., Martin, P.-M., Deybach, J.-C., Adès, J., Gorwood, P., and Gouya, L. (2010). A genetic schizophrenia-susceptibility region located between the ANKK1 and DRD2 genes. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 34, 492–499.

Ducci, F., Kaakinen, M., Pouta, A., Hartikainen, A.-L., Veijola, J., Isohanni, M., Charoen, P., Coin, L., Hoggart, C., Ekelund, J., et al. (2011). TTC12-ANKK1-DRD2 and CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 influence different pathways leading to smoking behavior from adolescence to mid-adulthood. *Biological Psychiatry* 69, 650–660.

Dudbridge, F. (2013). Power and predictive accuracy of polygenic risk scores. *PLoS Genet* 9, e1003348.

Dunlop, B. W., and Nemeroff, C. B. (2007). The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Arch. Gen. Psychiatry* 64, 327–337.

Ebejer, J. L., Medland, S. E., van der Werf, J., Gondro, C., Henders, A. K., Lynskey, M., Martin, N. G., and Duffy, D. L. (2012). Attention deficit hyperactivity disorder in Australian adults: prevalence, persistence, conduct problems and disadvantage. *PLoS ONE* 7, e47404.

Ebstein, R. P., Novick, O., Umansky, R., Priel, B., Osher, Y., Blaine, D., Bennett, E. R., Nemanov, L., Katz, M., and Belmaker, R. H. (1996). Dopamine D4 receptor (D4DR) exon III polymorphism associated with the human personality trait of Novelty Seeking. *Nat. Genet.* 12, 78–80.

Edenberg, H. J., Koller, D. L., Xuei, X., Wetherill, L., McClintick, J. N., Almasy, L., Bierut, L. J., Bucholz, K. K., Goate, A., Aliev, F., et al. (2010). Genome-Wide Association Study of Alcohol Dependence Implicates a Region on Chromosome 11. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 34, 840–852.

Edwards, A. C., and Kendler, K. S. (2013). Alcohol consumption in men is influenced by qualitatively different genetic factors in adolescence and adulthood. *Psychol. Med.*, 1–12.

Edwards, A. C., and Kendler, K. S. (2012). Twin study of the relationship between adolescent attention-deficit/hyperactivity disorder and adult alcohol dependence. *J Stud Alcohol Drugs* 73, 185–194.

Eisenberg, D. T. A., MacKillop, J., Modi, M., Beauchemin, J., Dang, D., Lisman, S. A., Lum, J. K., and Wilson, D. S. (2007). Examining impulsivity as an endophenotype using a behavioral approach: a DRD2 TaqI A and DRD4 48-bp VNTR association study. *Behav Brain Funct* 3, 2.

Elia, J., Arcos-Burgos, M., Bolton, K. L., Ambrosini, P. J., Berrettini, W., and Muenke, M. (2009). ADHD latent class clusters: DSM-IV subtypes and comorbidity. *Psychiatry Research* 170, 192–198.

Elkins, I. J., McGue, M., and Iacono, W. G. (2007). Prospective effects of attention-deficit/hyperactivity disorder, conduct disorder, and sex on adolescent substance use and abuse. *Arch. Gen. Psychiatry* 64, 1145–1152.

Emily, M., Mailund, T., Hein, J., Schauer, L., and Schierup, M. H. (2009). Using biological networks to search for interacting loci in genome-wide association studies. *European Journal of Human Genetics* *17*, 1231–1240.

Etter, J.-F. (2010). Smoking and Cloninger's Temperament and Character Inventory. *Nicotine & Tobacco Res.* *12*, 919–926

Faraone, S. V., Doyle, A. E., Mick, E., and Biederman, J. (2001). Meta-analysis of the association between the 7-repeat allele of the dopamine D(4) receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* *158*, 1052–1057.

Faraone, S. V., Perlis, R. H., Doyle, A. E., Smoller, J. W., Goralnick, J. J., Holmgren, M. A., and Sklar, P. (2005). Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *BPS* *57*, 1313–1323.

Faraone, S. V., Kunwar, A., Adamson, J., and Biederman, J. (2009). Personality traits among ADHD adults: implications of late-onset and subthreshold diagnoses. *Psychol. Med.* *39*, 685–693.

Fergusson, D. M., Horwood, L. J., and Ridder, E. M. (2007). Conduct and attentional problems in childhood and adolescence and later substance use, abuse and dependence: results of a 25-year longitudinal study. *Drug and Alcohol Dependence* *88 Suppl 1*, S14–26.

Fiorentini, C., Guerra, N., Facchetti, M., Finardi, A., Tiberio, L., Schiaffonati, L., Spano, P., and Missale, C. (2002). Nerve growth factor regulates dopamine D(2) receptor expression in prolactinoma cell lines via p75(NGFR)-mediated activation of nuclear factor-kappaB. *Mol. Endocrinol.* *16*, 353–366.

Fisher, R. A. (1918). The correlations between relatives on the supposition of Mendelian inheritance. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh* *52*, 399–433.

Frank, M. J., e Hutchison, K. (2009). Genetic contributions to avoidance-based decisions: striatal D2 receptor polymorphisms. *Neuroscience* *164*, 131–140.

Franke, B., Faraone, S. V., Asherson, P., Buitelaar, J., Bau, C. H. D., Ramos-Quiroga, J. A., Mick, E., Grevet, E. H., Johansson, S., Haavik, J., et al. (2012). The genetics of attention deficit/hyperactivity disorder in adults, a review. *Mol Psychiatry* *17*, 960–987.

Fuentes D, Tavares H, Camargo CHP, Gorenstein C. (1999) Inventário de Temperamento e Caráter de Cloninger — validação da versão em Português. *Revista de Psiquiatria Clínica*. 26: 363–376.

Gabriel, S. B., Schaffner, S. F., Nguyen, H., Moore, J. M., Roy, J., Blumenstiel, B., Higgins, J., DeFelice, M., Lochner, A., Faggart, M., et al. (2002). The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296, 2225–2229.

Gelernter, J., Yu, Y., Weiss, R., Brady, K., Panhuysen, C., Yang, B.-Z., Kranzler, H. R., and Farrer, L. (2006). Haplotype spanning TTC12 and ANKK1, flanked by the DRD2 and NCAM1 loci, is strongly associated to nicotine dependence in two distinct American populations. *Human Molecular Genetics* 15, 3498–3507.

Genro, J.P., Kieling, C., Rohde, L.A., & Hutz, M.H. (2010). Attention-deficit/hyperactivity disorder and the dopaminergic hypotheses. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 10, 587–601.

Gibbons, A. S., Thomas, E. A., and Dean, B. (2009). Regional and duration of illness differences in the alteration of NCAM-180 mRNA expression within the cortex of subjects with schizophrenia. *Schizophrenia Research* 112, 65–71.

Gizer, I. R., Ficks, C., and Waldman, I. D. (2009). Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet* 126, 51–90.

Gnanapavan, S., and Giovannoni, G. (2013). Neural cell adhesion molecules in brain plasticity and disease. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 2, 13–20.

Gomez, R., Woodworth, R., Waugh, M., and Corr, P. J. (2012). Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder symptoms in an adult sample: Associations with Cloninger's temperament and character dimensions. *Personality and Individual Differences* 52, 290–294.

Gorwood, P., Le Strat, Y., Ramoz, N., Dubertret, C., Moalic, J.-M., and Simonneau, M. (2012). Genetics of dopamine receptors and drug addiction. *Hum Genet* 131, 803–822.

González, S., Rangel-Barajas, C., Peper, M., Lorenzo, R., Moreno, E., Ciruela, F., Borycz, J., Ortiz, J., Lluís, C., Franco, R., et al. (2012). Dopamine D4 receptor, but not the ADHD-associated D4.7 variant, forms functional heteromers with the dopamine D2S receptor in the brain. *Mol Psychiatry* 17, 650–662.

Green, R.E., Krause, J., Briggs, A.W., Maricic, T., Stenzel, U., Kircher, M., Patterson, N., Li, H., Zhai, W., Fritz, M.H.Y., et al. (2010) A draft sequence of the Neandertal genome. *Science* 328, 710-722.

Grevet, E. H., Bau, C. H. D., Salgado, C. A. I., Fischer, A. G., Kalil, K., Victor, M. M., Garcia, C. R., Sousa, N. O., Rohde, L. A., and Belmonte-de-Abreu, P. (2006). Lack of gender effects on subtype outcomes in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: support for the validity of subtypes. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 256, 311–319.

Grevle, L., Güzey, C., Hadidi, H., Brennersted, R., Idle, J. R., and Aasly, J. (2000). Allelic association between the DRD2 TaqI A polymorphism and Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 15, 1070–1074.

Gudbjartsson, D. F., Walters, G. B., Thorleifsson, G., Stefansson, H., Halldorsson, B. V., Zusmanovich, P., Sulem, P., Thorlacius, S., Gylfason, A., Steinberg, S., et al. (2008). Many sequence variants affecting diversity of adult human height. *Nature Publishing Group* 40, 609–615.

Hamdi, N. R., and Iacono, W. G. (2013). Lifetime prevalence and comorbidity of externalizing disorders and depression in prospective assessment. *Psychol. Med.*, 1–10.

Hamshere, M. L., Langley, K., Martin, J., Agha, S. S., Stergiakouli, E., Anney, R. J. L., Buitelaar, J., Faraone, S. V., Lesch, K. P., Neale, B. M., et al. (2013). High Loading of Polygenic Risk for ADHD in Children With Comorbid Aggression. *American Journal of Psychiatry*.

Hasin, D. S., Goodwin, R. D., Stinson, F. S., and Grant, B. F. (2005). Epidemiology of major depressive disorder: results from the National Epidemiologic Survey on Alcoholism and Related Conditions. *Arch. Gen. Psychiatry* 62, 1097–1106.

Hansen, S. M., Berezin, V., and Bock, E. (2008). Signaling mechanisms of neurite outgrowth induced by the cell adhesion molecules NCAM and N-cadherin. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3809–3821.

Hasin, D. S., Stinson, F. S., Ogburn, E., and Grant, B. F. (2007). Prevalence, correlates, disability, and comorbidity of DSM-IV alcohol abuse and dependence in the United States: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *Arch. Gen. Psychiatry* 64, 830–842.

Hayden, E. P., Klein, D. N., Dougherty, L. R., Olino, T. M., Lipton, R. S., Dyson, M. W., Bufferd, S. J., Durbin, C. E., Sheikh, H. I., and Singh, S. M. (2010).

The dopamine D2 receptor gene and depressive and anxious symptoms in childhood: associations and evidence for gene-environment correlation and gene-environment interaction. *Psychiatric Genetics* 20, 304–310.

Hemani, G., Knott, S., and Haley, C. (2013a). An evolutionary perspective on epistasis and the missing heritability. *PLoS Genet* 9, e1003295.

Hemani, G., Knott, S., and Haley, C. (2013b). An evolutionary perspective on epistasis and the missing heritability. *PLoS Genet* 9, e1003295.

Hicks, B. M., Krueger, R. F., Iacono, W. G., McGue, M., and Patrick, C. J. (2004). Family transmission and heritability of externalizing disorders: a twin-family study. *Arch. Gen. Psychiatry* 61, 922–928.

Hill, S. Y., Shen, S., Lowers, L., Locke-Wellman, J., Matthews, A. G., and McDermott, M. (2008). Psychopathology in offspring from multiplex alcohol dependence families with and without parental alcohol dependence: a prospective study during childhood and adolescence. *Psychiatry Research* 160, 155–166.

Hill, S. Y., Zezza, N., Wipprecht, G., Locke, J., and Neiswanger, K. (1999). Personality traits and dopamine receptors (D2 and D4): linkage studies in families of alcoholics. *Am. J. Med. Genet.* 88, 634–641.

Hink, L. K., Rhee, S. H., Corley, R. P., Cosgrove, V. E., Hewitt, J. K., Schulz-Heik, R. J., Lahey, B. B., and Waldman, I. D. (2013). Personality Dimensions as Common and Broadband-Specific Features for Internalizing and Externalizing Disorders. *J Abnorm Child Psychol.*

Hinney, A., Scherag, A., Jarick, I., Albayrak, Ö., Pütter, C., Pechlivanis, S., Dauvermann, M. R., Beck, S., Weber, H., Scherag, S., et al. (2011). Genome-wide association study in German patients with attention deficit/hyperactivity disorder. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 156B, 888–897.

Hirvonen, M., Laakso, A., Någren, K., Rinne, J. O., Pohjalainen, T., and Hietala, J. (2004). C957T polymorphism of the dopamine D2 receptor (DRD2) gene affects striatal DRD2 availability in vivo. *Mol Psychiatry* 9, 1060–1061.

Hirvonen, M., Laakso, A., Någren, K., Rinne, J. O., Pohjalainen, T., and Hietala, J. (2005). C957T polymorphism of the dopamine D2 receptor (DRD2) gene affects striatal DRD2 availability in vivo. *Mol Psychiatry* 10, 889–889.

Hirvonen, M. M., Laakso, A., Någren, K., Rinne, J. O., Pohjalainen, T., and Hietala, J. (2009a). C957T polymorphism of dopamine D2 receptor gene affects

striatal DRD2 in vivo availability by changing the receptor affinity. *Synapse* 63, 907–912.

Hirvonen, M. M., Lumme, V., Hirvonen, J., Pesonen, U., Någren, K., Vahlberg, T., Scheinin, H., and Hietala, J. (2009b). C957T polymorphism of the human dopamine D2 receptor gene predicts extrastriatal dopamine receptor availability in vivo. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 33, 630–636.

Hoienicka, J., Quiñones-Lombraña, A., España-Serrano, L., Alvira-Botero, X., Kremer, L., Pérez-González, R., Rodríguez-Jiménez, R., Jiménez-Arriero, M. A., Ponce, G., and Palomo, T. (2010). The ANKK1 gene associated with addictions is expressed in astroglial cells and upregulated by apomorphine. *Biological Psychiatry* 67, 3–11.

Huang, W., Payne, T. J., Ma, J. Z., Beuten, J., Dupont, R. T., Inohara, N., and Li, M. D. (2009). Significant association of ANKK1 and detection of a functional polymorphism with nicotine dependence in an African-American sample. *Neuropsychopharmacology* 34, 319–330.

Hurst, L. D., Pál, C., and Lercher, M. J. (2004). The evolutionary dynamics of eukaryotic gene order. *Nat Rev Genet* 5, 299–310.

Huuhka, K., Anttila, S., Huuhka, M., Hietala, J., Huhtala, H., Mononen, N., Lehtimäki, T., and Leinonen, E. (2008). Dopamine 2 receptor C957T and catechol-o-methyltransferase Val158Met polymorphisms are associated with treatment response in electroconvulsive therapy. *Neuroscience Letters* 448, 79–83.

Jacob, C. P., Romanos, J., Dempfle, A., Heine, M., Windemuth-Kieselbach, C., Kruse, A., Reif, A., Walitza, S., Romanos, M., Strobel, A., et al. (2007a). Comorbidity of adult attention-deficit/hyperactivity disorder with focus on personality traits and related disorders in a tertiary referral center. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 257, 309–317.

Jacob, C. P., Romanos, J., Dempfle, A., Heine, M., Windemuth-Kieselbach, C., Kruse, A., Reif, A., Walitza, S., Romanos, M., Strobel, A., et al. (2007b). Comorbidity of adult attention-deficit/hyperactivity disorder with focus on personality traits and related disorders in a tertiary referral center. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 257, 309–317.

Jacobsen, L. K., Pugh, K. R., Mencl, W. E., and Gelernter, J. (2006). C957T polymorphism of the dopamine D2 receptor gene modulates the effect of nicotine on working memory performance and cortical processing efficiency. *Psychopharmacology* 188, 530–540.

Janga, S. C., Collado-Vides, J., and Babu, M. M. (2008). Transcriptional regulation constrains the organization of genes on eukaryotic chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 15761–15766.

Jönsson, E. G., Nothen, M. M., Grünhage, F., Farde, L., Nakashima, Y., Propping, P., and Sedvall, G. C. (1999). Polymorphisms in the dopamine D2 receptor gene and their relationships to striatal dopamine receptor density of healthy volunteers. *Mol Psychiatry* 4, 290–296.

Jürgenson, M., Aonurm-Helm, A., and Zharkovsky, A. (2012). Partial reduction in neural cell adhesion molecule (NCAM) in heterozygous mice induces depression-related behaviour without cognitive impairment. *Brain Research* 1447, 106–118.

Kadesjö, B., and Gillberg, C. (2001). The comorbidity of ADHD in the general population of Swedish school-age children. *J Child Psychol Psychiatry* 42, 487–492.

Katoh M and Katoh M (2003) Identification and characterization of *TPARM* gene in silico. *Int J Oncol.* 23:1213-1217.

Kazantseva, A., Gaysina, D., Malykh, S., and Khusnutdinova, E. (2011). The role of dopamine transporter (SLC6A3) and dopamine D2 receptor/ankyrin repeat and kinase domain containing 1 (DRD2/ANKK1) gene polymorphisms in personality traits. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 35, 1033–1040.

Kendler, K. S., Kalsi, G., Holmans, P. A., Sanders, A. R., Aggen, S. H., Dick, D. M., Aliev, F., Shi, J., Levinson, D. F., and Gejman, P. V. (2011). Genomewide association analysis of symptoms of alcohol dependence in the molecular genetics of schizophrenia (MGS2) control sample. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 35, 963–975.

Kendler, K. S., Myers, J., and Prescott, C. A. (2007a). Specificity of genetic and environmental risk factors for symptoms of cannabis, cocaine, alcohol, caffeine, and nicotine dependence. *Arch. Gen. Psychiatry* 64, 1313–1320.

Kendler, K. S., Gardner, C. O., Gatz, M., and Pedersen, N. L. (2007b). The sources of co-morbidity between major depression and generalized anxiety disorder in a Swedish national twin sample. *Psychol. Med.* 37, 453–462.

Kendler, K. S., Prescott, C. A., Myers, J., and Neale, M. C. (2003). The structure of genetic and environmental risk factors for common psychiatric and substance use disorders in men and women. *Arch. Gen. Psychiatry* 60, 929–937.

Kendler, K. S., Aggen, S. H., Knudsen, G. P., Røysamb, E., Neale, M. C., and Reichborn-Kjennerud, T. (2011). The structure of genetic and environmental risk factors for syndromal and subsyndromal common DSM-IV axis I and all axis II disorders. *American Journal of Psychiatry* 168, 29–39.

Kendler, K. S., and Myers, J. (2013). The boundaries of the internalizing and externalizing genetic spectra in men and women. *Psychol. Med.*, 1–9.

Kessler, R. C., Ormel, J., Petukhova, M., McLaughlin, K. A., Green, J. G., Russo, L. J., Stein, D. J., Zaslavsky, A. M., Aguilar-Gaxiola, S., Alonso, J., et al. (2011a). Development of lifetime comorbidity in the World Health Organization world mental health surveys. *Arch. Gen. Psychiatry* 68, 90–100.

Kessler, R. C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Merikangas, K. R., and Walters, E. E. (2005). Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch. Gen. Psychiatry* 62, 593–602.

Kessler, R. C., Green, J. G., Adler, L. A., Barkley, R. A., Chatterji, S., Faraone, S. V., Finkelman, M., Greenhill, L. L., Gruber, M. J., Jewell, M., et al. (2010). Structure and diagnosis of adult attention-deficit/hyperactivity disorder: analysis of expanded symptom criteria from the Adult ADHD Clinical Diagnostic Scale. *Arch. Gen. Psychiatry* 67, 1168–1178.

Kessler, R. C., Adler, L., Barkley, R., Biederman, J., Conners, C. K., Demler, O., Faraone, S. V., Greenhill, L. L., Howes, M. J., Secnik, K., et al. (2006). The prevalence and correlates of adult ADHD in the United States: results from the National Comorbidity Survey Replication. *Am J Psychiatry* 163, 716–723.

Kessler, R. C., Petukhova, M., and Zaslavsky, A. M. (2011b). The role of latent internalizing and externalizing predispositions in accounting for the development of comorbidity among common mental disorders. *Curr Opin Psychiatry* 24, 307–312.

Khan, A. A., Jacobson, K. C., GARDNER, C. O., Prescott, C. A., and Kendler, K. S. (2005). Personality and comorbidity of common psychiatric disorders. *The British Journal of Psychiatry* 186, 190–196.

Kim-Cohen, J., Caspi, A., Moffitt, T. E., Harrington, H., Milne, B. J., and Poulton, R. (2003). Prior juvenile diagnoses in adults with mental disorder: developmental follow-back of a prospective-longitudinal cohort. *Arch. Gen. Psychiatry* 60, 709–717.

Kiyohara, C., Miyake, Y., Koyanagi, M., Fujimoto, T., Shirasawa, S., Tanaka, K., Fukushima, W., Sasaki, S., Tsuboi, Y., Yamada, T., et al. (2011). Genetic polymorphisms involved in dopaminergic neurotransmission and risk for Parkinson's disease in a Japanese population. *BMC Neurol* 11, 89.

Klimek, V., Schenck, J. E., Han, H., Stockmeier, C. A., and Ordway, G. A. (2002). Dopaminergic abnormalities in amygdaloid nuclei in major depression: a postmortem study. *BPS* 52, 740–748.

Kluger, A. N., Siegfried, Z., and Ebstein, R. P. (2002). A meta-analysis of the association between DRD4 polymorphism and novelty seeking. *Mol Psychiatry* 7, 712–717.

Kooij, S. J. J., Bejerot, S., Blackwell, A., Caci, H., Casas-Brugué, M., Carpentier, P. J., Edvinsson, D., Fayyad, J., Foeken, K., Fitzgerald, M., et al. (2010). European consensus statement on diagnosis and treatment of adult ADHD: The European Network Adult ADHD. *BMC Psychiatry* 10, 67.

Krueger, R. F. (1999). The structure of common mental disorders. *Arch. Gen. Psychiatry* 56, 921–926.

Krueger, R. F., McGue, M., and Iacono, W. G. (2001). The higher-order structure of common DSM mental disorders: Internalization, externalization, and their connections to personality. *Personality and Individual Differences* 30, 1245–1259.

Kuperman, S., Schlosser, S. S., Kramer, J. R., Bucholz, K., Hesselbrock, V., Reich, T., and Reich, W. (2001). Developmental sequence from disruptive behavior diagnosis to adolescent alcohol dependence. *Am J Psychiatry* 158, 2022–2026.

Lahey, B. B., Van Hulle, C. A., Singh, A. L., Waldman, I. D., and Rathouz, P. J. (2011). Higher-order genetic and environmental structure of prevalent forms of child and adolescent psychopathology. *Arch. Gen. Psychiatry* 68, 181–189.

Laakso, A., Pohjalainen, T., Bergman, J., Kajander, J., Haaparanta, M., Solin, O., Syvälahti, E., and Hietala, J. (2005). The A1 allele of the human D2 dopamine receptor gene is associated with increased activity of striatal L-amino acid decarboxylase in healthy subjects. *Pharmacogenetics and Genomics* 15, 387–391.

Lasky-Su, J., Neale, B. M., Franke, B., Anney, R. J. L., Zhou, K., Maller, J. B., Vasquez, A. A., Chen, W., Asherson, P., Buitelaar, J., et al. (2008). Genome-wide association scan of quantitative traits for attention deficit hyperactivity

disorder identifies novel associations and confirms candidate gene associations. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* *147B*, 1345–1354.

Lawford, B. R., Young, R. M., Noble, E. P., Sargent, J., Rowell, J., Shadforth, S., Zhang, X., and Ritchie, T. (2000). The D(2) dopamine receptor A(1) allele and opioid dependence: association with heroin use and response to methadone treatment. *Am. J. Med. Genet.* *96*, 592–598.

Lawford, B. R., Young, R., Noble, E. P., Kann, B., and Ritchie, T. (2006). The D2 dopamine receptor (DRD2) gene is associated with co-morbid depression, anxiety and social dysfunction in untreated veterans with post-traumatic stress disorder. *Eur. Psychiatry* *21*, 180–185.

Le Foll, B., Gallo, A., Le Strat, Y., Lu, L., and Gorwood, P. (2009). Genetics of dopamine receptors and drug addiction: a comprehensive review. *Behavioural Pharmacology* *20*, 1–17.

Lee, S. S., Humphreys, K. L., Flory, K., Liu, R., and Glass, K. (2011). Prospective association of childhood attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and substance use and abuse/dependence: a meta-analytic review. *Clinical Psychology Review* *31*, 328–341.

Lee, H. F., e Wong, A.H.C. (2010). *The Dopamine Receptors (The Receptors)* 2nd ed. K. A. Neve, New York: Humana Press.

Lerman, C., Jepson, C., Wileyto, E. P., Epstein, L. H., Rukstalis, M., Patterson, F., Kaufmann, V., Restine, S., Hawk, L., Niaura, R., et al. (2006). Role of functional genetic variation in the dopamine D2 receptor (DRD2) in response to bupropion and nicotine replacement therapy for tobacco dependence: results of two randomized clinical trials. *Neuropsychopharmacology* *31*, 231–242.

Lesch, K. P., Timmesfeld, N., Renner, T. J., Halperin, R., Röser, C., Nguyen, T. T., Craig, D. W., 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*, 1573–1585.

Lettre, G., Jackson, A. U., Gieger, C., Schumacher, F. R., Berndt, S. I., Sanna, S., Eyheramendy, S., Voight, B. F., Butler, J. L., Guiducci, C., et al. (2008). Identification of ten loci associated with height highlights new biological pathways in human growth. *Nature Publishing Group* *40*, 584–591.

Levy, F. (1991). *The dopamine theory of attention deficit hyperactivity disorder*

(ADHD). *Aust. N.Z. J. Psychiatry* 25, 277–283.

Li, D., Sham, P. C., Owen, M. J., and He, L. (2006). Meta-analysis shows significant association between dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Human Molecular Genetics* 15, 2276–2284.

Li, M., Ma, J., and Beuten, J. (2004). Progress in searching for susceptibility loci and genes for smoking-related behaviour. *Clinical Genetics* 66, 382–392.

Liu, Y., Maxwell, S., Feng, T., Zhu, X., Elston, R. C., Koyutürk, M., and Chance, M. R. (2012). Gene, pathway and network frameworks to identify epistatic interactions of single nucleotide polymorphisms derived from GWAS data. *BMC Syst Biol* 6 Suppl 3, S15.

Lobo, D. S. S., Zawertailo, L., Selby, P., and Kennedy, J. L. (2012). The role of ANKK1 and TTC12 genes on drinking behaviour in tobacco dependent subjects. *World J Biol Psychiatry* 13, 232–238.

Ma, L., Brautbar, A., Boerwinkle, E., Sing, C. F., Clark, A. G., and Keinan, A. (2012). Knowledge-driven analysis identifies a gene-gene interaction affecting high-density lipoprotein cholesterol levels in multi-ethnic populations. *PLoS Genet* 8, e1002714.

Maes, H. H., Silberg, J. L., Neale, M. C., and Eaves, L. J. (2007). Genetic and cultural transmission of antisocial behavior: an extended twin parent model. *Twin Res Hum Genet* 10, 136–150.

Maldonado, R., Saiardi, A., Valverde, O., Samad, T. A., Roques, B. P., and Borrelli, E. (1997). Absence of opiate rewarding effects in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature* 388, 586–589.

Manolio, T. A., Collins, F. S., Cox, N. J., Goldstein, D. B., Hindorff, L. A., Hunter, D. J., McCarthy, M. I., Ramos, E. M., Cardon, L. R., Chakravarti, A., et al. (2009). Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 461, 747–753.

McClellan, J., and King, M.-C. (2010). Genetic heterogeneity in human disease. *Cell* 141, 210–217.

Melis, M., Spiga, S., and Diana, M. (2005). The dopamine hypothesis of drug addiction: hypodopaminergic state. *Int. Rev. Neurobiol.* 63, 101–154.

Merwood, A., Asherson, P., and Larsson, H. (2013). Genetic associations between the ADHD symptom dimensions and Cloninger's temperament dimensions in adult twins. *Eur Neuropsychopharmacol* 23, 416–425.

Michaely, P., Tomchick, D. R., Machius, M., and Anderson, R. G. W. (2002). Crystal structure of a 12 ANK repeat stack from human ankyrinR. *EMBO J.* *21*, 6387–6396.

Michalak, P. (2008). Coexpression, coregulation, and cofunctionality of neighboring genes in eukaryotic genomes. *Genomics* *91*, 243–248.

Mick, E., Todorov, A., Smalley, S., Hu, X., Loo, S., Todd, R. D., Biederman, J., Byrne, D., Dechairo, B., Guiney, A., et al. (2010). Family-based genome-wide association scan of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry* *49*, 898–905.e3.

Middeldorp, C. M., CATH, D. C., van DYCK, R., and Boomsma, D. I. (2005). The co-morbidity of anxiety and depression in the perspective of genetic epidemiology. A review of twin and family studies. *Psychol. Med.* *35*, 611–624.

Miettunen, J., and Raevuori, A. (2012). A meta-analysis of temperament in axis I psychiatric disorders. *Comprehensive Psychiatry* *53*, 152–166.

Mikolajewski, A. J., Allan, N. P., Hart, S. A., Lonigan, C. J., and Taylor, J. (2013). Negative affect shares genetic and environmental influences with symptoms of childhood internalizing and externalizing disorders. *J Abnorm Child Psychol* *41*, 411–423.

Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., and Caron, M. G. (1998). Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews* *78*, 189–225.

Monakhov, M., Golimbet, V., Abramova, L., Kaleda, V., and Karpov, V. (2008). Association study of three polymorphisms in the dopamine D2 receptor gene and schizophrenia in the Russian population. *Schizophrenia Research* *100*, 302–307.

Moore, J. H., and Williams, S. M. (2009). Epistasis and its implications for personal genetics. *Am. J. Hum. Genet.* *85*, 309–320.

Mota, N. R., Rovaris, D. L., Bertuzzi, G. P., Contini, V., Vitola, E. S., Grevet, E. H., Roman, T., Callegari-Jacques, S. M., Hutz, M. H., and Bau, C. H. D. (2013). DRD2/DRD4 heteromerization may influence genetic susceptibility to alcohol dependence. *Mol Psychiatry* *18*, 401–402.

Mota, N. R., Bau, C. H. D., Banaschewski, T., Buitelaar, J. K., Ebstein, R. P., Franke, B., Gill, M., Kuntsi, J., Manor, I., Miranda, A., Mulas, F., Oades, R. D., Roeyers, H., Rothenberger, A., Sergeant, J. A., Sonuga-Barke, E. J., Steinhausen,

H., Faraone, S. V., Asherson, P. Association between *DRD2/DRD4* interaction and Conduct Disorder: a potential developmental pathway to alcohol dependence. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. *In press*.

Moyer, R. A., Wang, D., Papp, A. C., Smith, R. M., Duque, L., Mash, D. C., and Sadee, W. (2011). Intronic polymorphisms affecting alternative splicing of human dopamine D2 receptor are associated with cocaine abuse. *Neuropsychopharmacology* 36, 753–762.

Müller, D. J., Chiesa, A., Mandelli, L., De Luca, V., De Ronchi, D., Jain, U., Serretti, A., and Kennedy, J. L. (2010). Correlation of a set of gene variants, life events and personality features on adult ADHD severity. *Journal of Psychiatric Research* 44, 598–604.

Munafò, M., Clark, T., Johnstone, E., Murphy, M., and Walton, R. (2004). The genetic basis for smoking behavior: a systematic review and meta-analysis. *Nicotine Tob. Res.* 6, 583–597.

Munafò, M. R., Yalcin, B., Willis-Owen, S. A., and FLINT, J. (2008). Association of the dopamine D4 receptor (*DRD4*) gene and approach-related personality traits: meta-analysis and new data. *Biological Psychiatry* 63, 197–206.

Munafò, M. R., Matheson, I. J., and Flint, J. (2007). Association of the *DRD2* gene Taq1A polymorphism and alcoholism: a meta-analysis of case-control studies and evidence of publication bias. *Mol Psychiatry* 12, 454–461.

Munafò, M. R., Timpson, N. J., David, S. P., Ebrahim, S., and Lawlor, D. A. (2009). Association of the *DRD2* gene Taq1A polymorphism and smoking behavior: a meta-analysis and new data. *Nicotine Tob. Res.* 11, 64–76.

Nadder, T. S., Rutter, M., Silberg, J. L., Maes, H. H., and Eaves, L. J. (2002). Genetic effects on the variation and covariation of attention deficit-hyperactivity disorder (ADHD) and oppositional-defiant disorder/conduct disorder (Odd/CD) symptomatologies across informant and occasion of measurement. *Psychol. Med.* 32, 39–53.

Nader, M. A., Morgan, D., Gage, H. D., Nader, S. H., Calhoun, T. L., Buchheimer, N., Ehrenkauf, R., and Mach, R. H. (2006). PET imaging of dopamine D2 receptors during chronic cocaine self-administration in monkeys. *Nat Neurosci* 9, 1050–1056.

Nazarian, A., Sichtig, H., and Riva, A. (2012). A knowledge-based method for association studies on complex diseases. *PLoS ONE* 7, e44162.

Nácher, J., Guirado, R., and Castillo-Gómez, E. (2013). Structural Plasticity of Interneurons in the Adult Brain: Role of PSA-NCAM and Implications for Psychiatric Disorders. *Neurochem Res* 38, 1122–1133.

Neale, B. M., Lasky-Su, J., Anney, R., Franke, B., Zhou, K., Maller, J. B., Vasquez, A. A., 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, 1337–1344.

Neale, B. M., Medland, S., Ripke, S., Anney, R. J. L., Asherson, P., Buitelaar, J., Franke, B., Gill, M., Kent, L., Holmans, P., et al. (2010a). Case-control genome-wide association study of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry* 49, 906–920.

Neale, B. M., Medland, S. E., Ripke, S., Asherson, P., Franke, B., Lesch, K. P., Faraone, S. V., Nguyen, T. T., Schäfer, H., Holmans, P., et al. (2010b). Meta-analysis of genome-wide association studies of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry* 49, 884–897.

Nelson, E. C., Lynskey, M. T., Heath, A. C., Wray, N., Agrawal, A., Shand, F. L., Henders, A. K., Wallace, L., Todorov, A. A., Schrage, A. J., et al. (2013). ANKK1, TTC12, and NCAM1 polymorphisms and heroin dependence: importance of considering drug exposure. *JAMA Psychiatry* 70, 325–333.

Neville, M. J., Johnstone, E. C., and Walton, R. T. (2004). Identification and characterization of ANKK1: a novel kinase gene closely linked to DRD2 on chromosome band 11q23.1. *Hum. Mutat.* 23, 540–545.

Noble, E. P., Blum, K., Khalsa, M. E., Ritchie, T., Montgomery, A., Wood, R. C., Fitch, R. J., Ozkaragoz, T., Sheridan, P. J., and Anglin, M. D. (1993). Allelic association of the D2 dopamine receptor gene with cocaine dependence. *Drug and Alcohol Dependence* 33, 271–285.

Noble, E. P., Blum, K., Ritchie, T., Montgomery, A., and Sheridan, P. J. (1991). Allelic association of the D2 dopamine receptor gene with receptor-binding characteristics in alcoholism. *Arch. Gen. Psychiatry* 48, 648–654.

Noble, E. P., Ozkaragoz, T. Z., Ritchie, T. L., Zhang, X., Belin, T. R., and Sparkes, R. S. (1998). D2 and D4 dopamine receptor polymorphisms and personality. *Am. J. Med. Genet.* 81, 257–267.

Nyman, E. S., Loukola, A., Varilo, T., Ekelund, J., Veijola, J., Joukamaa, M., Taanila, A., Pouta, A., Miettunen, J., Freimer, N., et al. (2009). Impact of the

dopamine receptor gene family on temperament traits in a population-based birth cohort. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* *150B*, 854–865.

Okser, S., Pahikkala, T., and Aittokallio, T. (2013). Genetic variants and their interactions in disease risk prediction - machine learning and network perspectives. *BioData Mining* *6*, 5.

Oliveri, R. L., Annesi, G., Zappia, M., Civitelli, D., De Marco, E. V., Pasqua, A. A., Annesi, F., Spadafora, P., Gambardella, A., Nicoletti, G., et al. (2000). The dopamine D2 receptor gene is a susceptibility locus for Parkinson's disease. *Mov. Disord.* *15*, 127–131.

Ongur, D., Farabaugh, A., Iosifescu, D. V., Perlis, R., and Fava, M. (2005). Tridimensional personality questionnaire factors in major depressive disorder: relationship to anxiety disorder comorbidity and age of onset. *Psychother Psychosom* *74*, 173–178.

Oortmerssen, K. V. E.-V., van de Glind, G., van den Brink, W., Smit, F., Crunelle, C. L., Swets, M., and Schoevers, R. A. (2012). Prevalence of attention-deficit hyperactivity disorder in substance use disorder patients: a meta-analysis and meta-regression analysis. *Drug and Alcohol Dependence* *122*, 11–19.

Palmer, R. H. C., Button, T. M., Rhee, S. H., Corley, R. P., Young, S. E., Stallings, M. C., Hopfer, C. J., and Hewitt, J. K. (2012). Genetic etiology of the common liability to drug dependence: evidence of common and specific mechanisms for DSM-IV dependence symptoms. *Drug and Alcohol Dependence* *123 Suppl 1*, S24–32.

Palmer, R. H. C., Knopik, V. S., Rhee, S. H., Hopfer, C. J., Corley, R. C., Young, S. E., Stallings, M. C., and Hewitt, J. K. (2013). Prospective effects of adolescent indicators of behavioral disinhibition on DSM-IV alcohol, tobacco, and illicit drug dependence in young adulthood. *Addictive Behaviors* *38*, 2415–2421.

Pardini, D., White, H. R., and Stouthamer-Loeber, M. (2007). Early adolescent psychopathology as a predictor of alcohol use disorders by young adulthood. *Drug and Alcohol Dependence* *88 Suppl 1*, S38–49.

Parsons, M. J., Mata, I., Beperet, M., Iribarren-Iriso, F., Arroyo, B., Sainz, R., Arranz, M. J., and Kerwin, R. (2007). A dopamine D2 receptor gene-related polymorphism is associated with schizophrenia in a Spanish population isolate. *Psychiatric Genetics* *17*, 159–163.

Perera, S., Crewther, D., Croft, R., Keage, H., Hermens, D., and Clark, C. R. (2012). Comorbid externalising behaviour in AD/HD: evidence for a distinct pathological entity in adolescence. *PLoS ONE* 7, e41407.

Perez de los Cobos, J., Baiget, M., Trujols, J., Sinol, N., Volpini, V., Banuls, E., Calafell, F., Luquero, E., del Rio, E., and Alvarez, E. (2007). Allelic and genotypic associations of DRD2 TaqI A polymorphism with heroin dependence in Spanish subjects: a case control study. *Behav Brain Funct* 3, 25.

Phillips, P. C. (2008). Epistasis--the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nat Rev Genet* 9, 855–867.

Poelmans, G., Pauls, D. L., Buitelaar, J. K., and Franke, B. (2011). Integrated genome-wide association study findings: identification of a neurodevelopmental network for attention deficit hyperactivity disorder. *American Journal of Psychiatry* 168, 365–377.

Pohjalainen, T., Rinne, J. O., Någren, K., Lehtikainen, P., Anttila, K., Syvälahti, E. K., and Hietala, J. (1998). The A1 allele of the human D2 dopamine receptor gene predicts low D2 receptor availability in healthy volunteers. *Mol Psychiatry* 3, 256–260.

Polanczyk, G., de Lima, M. S., Horta, B. L., Biederman, J., and Rohde, L. A. (2007). The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry* 164, 942–948.

Ponce, G., Hoenicka, J., Jiménez-Arriero, M. A., Rodríguez-Jiménez, R., Aragües, M., Martín-Suné, N., Huertas, E., and Palomo, T. (2008). DRD2 and ANKK1 genotype in alcohol-dependent patients with psychopathic traits: association and interaction study. *The British Journal of Psychiatry* 193, 121–125.

Ponce, G., Jiménez-Arriero, M. A., Rubio, G., Hoenicka, J., Ampuero, I., Ramos, J. A., and Palomo, T. (2003). The A1 allele of the DRD2 gene (TaqI A polymorphisms) is associated with antisocial personality in a sample of alcohol-dependent patients. *Eur. Psychiatry* 18, 356–360.

Ponce, G., Hoenicka, J., Jiménez-Arriero, M. A., Rodríguez-Jiménez, R., Aragües, M., Martín-Suné, N., Huertas, E., and Palomo, T. (2008). DRD2 and ANKK1 genotype in alcohol-dependent patients with psychopathic traits: association and interaction study. *The British Journal of Psychiatry* 193, 121–125.

Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P. I. W., Daly, M. J., et al. (2007).

PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 559–575.

Purper-Ouakil, D., Cortese, S., Wohl, M., Aubron, V., Orejarena, S., Michel, G., Asch, M., Mouren, M.-C., and Gorwood, P. (2010). Temperament and character dimensions associated with clinical characteristics and treatment outcome in attention-deficit/hyperactivity disorder boys. *Comprehensive Psychiatry* 51, 286–292.

Reich, D., Green, R. E., Kircher, M., Krause, J., Patterson, N., Durand, E. Y., Viola, B., Briggs, A. W., Stenzel, U., Johnson, P. L. F., et al. (2010). Genetic history of an archaic hominin group from Denisova Cave in Siberia. *Nature* 468, 1053–1060.

Rettew, D. C., Copeland, W., Stanger, C., and Hudziak, J. J. (2004). Associations between temperament and DSM-IV externalizing disorders in children and adolescents. *J Dev Behav Pediatr* 25, 383–391.

Ritchie, M. D. (2011). Using biological knowledge to uncover the mystery in the search for epistasis in genome-wide association studies. *Ann. Hum. Genet.* 75, 172–182.

Roetker, N. S., Yonker, J. A., Lee, C., Chang, V., Basson, J. J., Roan, C. L., Hauser, T. S., Hauser, R. M., and Atwood, C. S. (2012). Multigene interactions and the prediction of depression in the Wisconsin Longitudinal Study. *BMJ Open* 2.

Rivera, A., Cuéllar, B., Girón, F. J., Grandy, D. K., la Calle, de, A., and Moratalla, R. (2002). Dopamine D4 receptors are heterogeneously distributed in the striosomes/matrix compartments of the striatum. *J. Neurochem.* 80, 219–229.

Rodríguez-Jiménez, R., Hoenicka, J., Jiménez-Arriero, M. A., Ponce, G., Bagny, A., Aragues, M., and Palomo, T. (2006a). Performance in the Wisconsin Card Sorting Test and the C957T polymorphism of the DRD2 gene in healthy volunteers. *Neuropsychobiology* 54, 166–170.

Rodríguez-Jiménez, R., Ávila, C., Ponce, G., Ibáñez, M. I., Rubio, G., Jiménez-Arriero, M. A., Ampuero, I., Ramos, J. A., Hoenicka, J., and Palomo, T. (2006b). The TaqIA polymorphism linked to the DRD2 gene is related to lower attention and less inhibitory control in alcoholic patients. *Eur. Psychiatry* 21, 66–69.

Rondou, P., Haegeman, G., and Van Craenenbroeck, K. (2010). The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 1971–1986.

Rösler, M., Casas, M., Konofal, E., and Buitelaar, J. (2010). Attention deficit hyperactivity disorder in adults. *World J Biol Psychiatry* 11, 684–698.

Rovaris, D. L., Mota, N. R., Callegari-Jacques, S. M., and Bau, C. H. D. (2013a). Approaching “phantom heritability” in psychiatry by hypothesis-driven gene-gene interactions. *Front Hum Neurosci* 7, 210.

Rovaris, D. L., Mota, N. R., de Azeredo, L. A., Cupertino, R. B., Bertuzzi, G. P., Polina, E. R., Contini, V., Kortmann, G. L., Vitola, E. S., Grevet, E. H., et al. (2013b). MR and GR functional SNPs may modulate tobacco smoking susceptibility. *J Neural Transm*.

Røysamb, E., Kendler, K. S., Tambs, K., Ørstavik, R. E., Neale, M. C., Aggen, S. H., Torgersen, S., and Reichborn-Kjennerud, T. (2011). The joint structure of DSM-IV Axis I and Axis II disorders. *Journal of Abnormal Psychology* 120, 198–209.

Rutishauser, U., and Goridis, C. (1986). NCAM: the molecule and its genetics. *Trends in Genetics* 2, 72–76.

Salgado, C. A. I., Bau, C. H. D., Grevet, E. H., Fischer, A. G., Victor, M. M., Kalil, K. L. S., Sousa, N. O., Garcia, C. R., and Belmonte-de-Abreu, P. (2009). Inattention and hyperactivity dimensions of ADHD are associated with different personality profiles. *Psychopathology* 42, 108–112.

Sartor, C. E., Lynskey, M. T., Heath, A. C., Jacob, T., and True, W. (2007). The role of childhood risk factors in initiation of alcohol use and progression to alcohol dependence. *Addiction* 102, 216–225.

Sato, C., and Kitajima, K. (2013). Impact of structural aberrancy of polysialic acid and its synthetic enzyme ST8SIA2 in schizophrenia. *Front Cell Neurosci* 7, 61.

Schinka, J. A., Letsch, E. A., and Crawford, F. C. (2002). DRD4 and novelty seeking: results of meta-analyses. *Am. J. Med. Genet.* 114, 643–648.

Schubiner, H., Tzelepis, A., Milberger, S., Lockhart, N., Kruger, M., Kelley, B. J., and Schoener, E. P. (2000). Prevalence of attention-deficit/hyperactivity disorder and conduct disorder among substance abusers. *J Clin Psychiatry* 61, 244–251.

Sémon, M., and Duret, L. (2006). Evolutionary origin and maintenance of coexpressed gene clusters in mammals. *Molecular Biology and Evolution* 23, 1715–1723.

Shen, L.-H., Liao, M.-H., and Tseng, Y.-C. (2012). Recent advances in imaging of dopaminergic neurons for evaluation of neuropsychiatric disorders. *J. Biomed. Biotechnol.* *2012*, 259349.

Simon, V., Czobor, P., Bálint, S., Mészáros, A., and Bitter, I. (2009). Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis. *Br J Psychiatry* *194*, 204–211.

Smith, L., Watson, M., Gates, S., Ball, D., and Foxcroft, D. (2008). Meta-analysis of the association of the Taq1A polymorphism with the risk of alcohol dependency: a HuGE gene-disease association review. *American Journal of Epidemiology* *167*, 125–138.

Smith, T. F. (2010). Meta-analysis of the heterogeneity in association of DRD4 7-repeat allele and AD/HD: stronger association with AD/HD combined type. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* *153B*, 1189–1199.

Sobanski, E. (2006). Psychiatric comorbidity in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* *256 Suppl 1*, i26–31.

Spencer, T., Biederman, J., WILENS, T., Harding, M., O'Donnell, D., and Griffin, S. (1996). Pharmacotherapy of attention-deficit hyperactivity disorder across the life cycle. *JAAC* *35*, 409–432.

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. *American Journal of Psychiatry* *169*, 186–194.

Stork, O., Welzl, H., Wotjak, C. T., Hoyer, D., Delling, M., Cremer, H., and Schachner, M. (1999). Anxiety and increased 5-HT_{1A} receptor response in NCAM null mutant mice. *J. Neurobiol.* *40*, 343–355.

Stork, O., Welzl, H., Wolfer, D., Schuster, T., Mantei, N., Stork, S., Hoyer, D., Lipp, H., Obata, K., and Schachner, M. (2000). Recovery of emotional behaviour in neural cell adhesion molecule (NCAM) null mutant mice through transgenic expression of NCAM180. *Eur. J. Neurosci.* *12*, 3291–3306.

Sullivan, P. F., Keefe, R. S. E., Lange, L. A., Lange, E. M., Stroup, T. S., Lieberman, J., and Maness, P. F. (2007). NCAM1 and neurocognition in schizophrenia. *BPS* *61*, 902–910.

Svingos, A. L., Periasamy, S., and Pickel, V. M. (2000). Presynaptic dopamine D(4) receptor localization in the rat nucleus accumbens shell. *Synapse* 36, 222–232.

Swagell, C. D., Lawford, B. R., Hughes, I. P., Voisey, J., Feeney, G. F. X., van Daal, A., Connor, J. P., Noble, E. P., Morris, C. P., and Young, R. M. (2012). DRD2 C957T and TaqIA genotyping reveals gender effects and unique low-risk and high-risk genotypes in alcohol dependence. *Alcohol and Alcoholism* 47, 397–403.

Swanson JM.(1992) School-based assessments and interventions for ADD students. Irvine, CA: KC Publishing

Swanson, J. M., Kinsbourne, M., Nigg, J., Lanphear, B., Stefanatos, G. A., Volkow, N., Taylor, E., Casey, B. J., Castellanos, F. X., and Wadhwa, P. D. (2007). Etiologic subtypes of attention-deficit/hyperactivity disorder: brain imaging, molecular genetic and environmental factors and the dopamine hypothesis. *Neuropsychol Rev* 17, 39–59.

Tackett, J. L., Waldman, I. D., Van Hulle, C. A., and Lahey, B. B. (2011). Shared genetic influences on negative emotionality and major depression/conduct disorder comorbidity. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry* 50, 818–827.

Teh, L. K., Izuddin, A. F., M H, F. H., Zakaria, Z. A., and Salleh, M. Z. (2012). Tridimensional personalities and polymorphism of dopamine D2 receptor among heroin addicts. *Biological Research For Nursing* 14, 188–196.

Thapar, A., Harrington, R., and McGuffin, P. (2001). Examining the comorbidity of ADHD-related behaviours and conduct problems using a twin study design. *The British Journal of Psychiatry* 179, 224–229.

Thompson, J., Thomas, N., Singleton, A., Piggott, M., Lloyd, S., Perry, E. K., Morris, C. M., Perry, R. H., Ferrier, I. N., and Court, J. A. (1997). D2 dopamine receptor gene (DRD2) Taq1 A polymorphism: reduced dopamine D2 receptor binding in the human striatum associated with the A1 allele. *Pharmacogenetics* 7, 479–484.

Tochigi, M., Iwamoto, K., Bundo, M., Sasaki, T., Kato, N., and Kato, T. (2008). Gene expression profiling of major depression and suicide in the prefrontal cortex of postmortem brains. *Neurosci. Res.* 60, 184–191.

Tripp, G., and Wickens, J. R. (2009). Neurobiology of ADHD. *Neuropharmacology* 57, 579–589.

Tsoory, M., Guterman, A., and Richter-Levin, G. (2008). Exposure to stressors during juvenility disrupts development-related alterations in the PSA-NCAM to NCAM expression ratio: potential relevance for mood and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology* 33, 378–393.

Tuithof, M., Have, ten, M., van den Brink, W., Vollebergh, W., and de Graaf, R. (2012). The role of conduct disorder in the association between ADHD and alcohol use (disorder). Results from the Netherlands Mental Health Survey and Incidence Study-2. *Drug and Alcohol Dependence* 123, 115–121.

Uhl, G. R., Drgon, T., Johnson, C., Fatusin, O. O., Liu, Q.-R., Contoreggi, C., Li, C.-Y., Buck, K., and Crabbe, J. (2008). “Higher order” addiction molecular genetics: convergent data from genome-wide association in humans and mice. *Biochemical Pharmacology* 75, 98–111.

Upadhyaya, H. P. (2008). Substance use disorders in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder: implications for treatment and the role of the primary care physician. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry* 10, 211–221.

Usiello, A., Baik, J. H., Rougé-Pont, F., Picetti, R., Dierich, A., LeMeur, M., Piazza, P. V., and Borrelli, E. (2000). Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature* 408, 199–203.

Varea, E., Guirado, R., Gilabert-Juan, J., Martí, U., Castillo-Gómez, E., Blasco-Ibáñez, J. M., Crespo, C., and Náchter, J. (2012). Expression of PSA-NCAM and synaptic proteins in the amygdala of psychiatric disorder patients. *Journal of Psychiatric Research* 46, 189–197.

Visscher, P. M. (2008). Sizing up human height variation. *Nature Publishing Group* 40, 489–490.

Vitola, E. S., Salgado, C. A. I., Silva, K. L., Karam, R. G., Victor, M. M., Mota, N. R., Contini, V., Picon, F. A., Guimarães-da-Silva, P. O., Giordani, R. S., 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, 94–99.

Voisey, J., Swagell, C. D., Hughes, I. P., van Daal, A., Noble, E. P., Lawford, B. R., Young, R. M., and Morris, C. P. (2012). A DRD2 and ANKK1 haplotype is associated with nicotine dependence. *Psychiatry Research* 196, 285–289.

Volkow, N. D., Fowler, J. S., Wang, G. J., Hitzemann, R., Logan, J., Schlyer, D. J., Dewey, S. L., and Wolf, A. P. (1993). Decreased dopamine D2 receptor availability is associated with reduced frontal metabolism in cocaine abusers. *Synapse* 14, 169–177.

Volkow, N. D., Fowler, J. S., Wang, G. J., Baler, R., and Telang, F. (2009). Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. *Neuropharmacology* 56 *Suppl 1*, 3–8.

Volkow, N. D., Wang, G.-J., Fowler, J. S., and Ding, Y.-S. (2005). Imaging the effects of methylphenidate on brain dopamine: new model on its therapeutic actions for attention-deficit/hyperactivity disorder. *BPS* 57, 1410–1415.

Wainwright, S. R., and Galea, L. A. M. (2013). The Neural Plasticity Theory of Depression: Assessing the Roles of Adult Neurogenesis and PSA-NCAM within the Hippocampus. *Neural Plasticity* 2013, 805497.

Walmod, P. S., Kolkova, K., Berezin, V., and Bock, E. (2004). Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction. *Neurochem Res* 29, 2015–2035.

Wang, F., Simen, A., Arias, A., Lu, Q.-W., and Zhang, H. (2013). A large-scale meta-analysis of the association between the ANKK1/DRD2 Taq1A polymorphism and alcohol dependence. *Hum Genet* 132, 347–358.

Weedon, M. N., Lango, H., Lindgren, C. M., Wallace, C., Evans, D. M., Mangino, M., Freathy, R. M., Perry, J. R. B., Stevens, S., Hall, A. S., et al. (2008). Genome-wide association analysis identifies 20 loci that influence adult height. *Nature Publishing Group* 40, 575–583.

Wender, P. H., Wolf, L. E., and Wasserstein, J. (2001). Adults with ADHD. An overview. *Annals of the New York Academy of Sciences* 931, 1–16.

Wernicke, C., Reese, J., Kraschewski, A., Winterer, G., Rommelspacher, H., and Gallinat, J. (2009). Distinct haplogenotypes of the dopamine D2 receptor gene are associated with non-smoking behaviour and daily cigarette consumption. *Pharmacopsychiatry* 42, 41–50.

White, M. J., Lawford, B. R., Morris, C. P., and Young, R. M. (2009). Interaction between DRD2 C957T polymorphism and an acute psychosocial stressor on reward-related behavioral impulsivity. *Behav Genet* 39, 285–295.

Wilens, T. E. (2004). Attention-deficit/hyperactivity disorder and the substance use disorders: the nature of the relationship, subtypes at risk, and treatment issues. *Psychiatr. Clin. North Am.* 27, 283–301.

Wise & Bozarth 1987 A Psychomotor Stimulant Theory of Addiction (2013).
Wise & Bozarth 1987 A Psychomotor Stimulant Theory of Addiction. 1–24.

Wise, R. A., and Bozarth, M. A. (1987). A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev* 94, 469–492.

Witkiewitz, K., King, K., McMahon, R. J., Wu, J., Luk, J., Bierman, K. L., Coie, J. D., Dodge, K. A., Greenberg, M. T., Lochman, J. E., et al. (2013). Evidence for a multi-dimensional latent structural model of externalizing disorders. *J Abnorm Child Psychol* 41, 223–237.

Wu, J., Xiao, H., Sun, H., Zou, L., and Zhu, L.-Q. (2012). Role of Dopamine Receptors in ADHD: A Systematic Meta-analysis. *Mol Neurobiol* 45, 605–620.

Xiao, M.-F., Xu, J.-C., Tereshchenko, Y., Novak, D., Schachner, M., and Kleene, R. (2009). Neural cell adhesion molecule modulates dopaminergic signaling and behavior by regulating dopamine D2 receptor internalization. *Journal of Neuroscience* 29, 14752–14763.

Xu, H., Kellendonk, C. B., Simpson, E. H., Keilp, J. G., Bruder, G. E., Polan, H. J., Kandel, E. R., and Gilliam, T. C. (2007). DRD2 C957T polymorphism interacts with the COMT Val158Met polymorphism in human working memory ability. *Schizophrenia Research* 90, 104–107.

Yang, B.-Z., Kranzler, H. R., Zhao, H., Gruen, J. R., Luo, X., and Gelernter, J. (2007). Association of haplotypic variants in DRD2, ANKK1, TTC12 and NCAM1 to alcohol dependence in independent case control and family samples. *Human Molecular Genetics* 16, 2844–2853.

Yang, B.-Z., Kranzler, H. R., Zhao, H., Gruen, J. R., Luo, X., and Gelernter, J. (2008). Haplotypic variants in DRD2, ANKK1, TTC12, and NCAM1 are associated with comorbid alcohol and drug dependence. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 32, 2117–2127.

Yang, J., Benyamin, B., McEvoy, B. P., Gordon, S., Henders, A. K., Nyholt, D. R., Madden, P. A., Heath, A. C., Martin, N. G., Montgomery, G. W., et al. (2010). Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height. *Nature Publishing Group* 42, 565–569.

Young, S. E., Stallings, M. C., Corley, R. P., Krauter, K. S., and Hewitt, J. K. (2000). Genetic and environmental influences on behavioral disinhibition. *Am. J. Med. Genet.* *96*, 684–695.

Zhang, Y., Bertolino, A., Fazio, L., Blasi, G., Rampino, A., Romano, R., Lee, M.-L. T., Xiao, T., Papp, A., Wang, D., et al. (2007). Polymorphisms in human dopamine D2 receptor gene affect gene expression, splicing, and neuronal activity during working memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *104*, 20552–20557.

Zuk, O., Hechter, E., Sunyaev, S. R., and Lander, E. S. (2012). The mystery of missing heritability: Genetic interactions create phantom heritability. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *109*, 1193–1198.

APPROACHING “PHANTOM HERITABILITY” IN PSYCHIATRY BY HYPOTHESIS-DRIVEN GENE-GENE INTERACTIONS

Frontiers in Human Neuroscience

(Publicado online em 16 de maio de 2013)

doi: 10.3389/fnhum.2013.00210



Approaching “phantom heritability” in psychiatry by hypothesis-driven gene–gene interactions

Diego Luiz Rovaris¹, Nina Roth Mota¹, Sidia Maria Callegari-Jacques^{1,2} and Claiton Henrique Dotto Bau^{1*}

¹ Department of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

² Department of Statistics, Instituto de Matemática, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

*Correspondence: claiton.bau@ufrgs.br

Edited by:

John J. Foxe, Albert Einstein College of Medicine, USA

Reviewed by:

Kevin Mitchell, Trinity College Dublin, Ireland

A commentary on

The mystery of missing heritability: genetic interactions create phantom heritability by Zuk, O., Hechter, E., Sunyaev, S. R., and Lander, E. S. (2012). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 1193–1198.

The so called “phantom heritability” has been haunting the scientific community for quite some time and it is now subject of intense debate. Zuk et al. (2012) acknowledged that even if we identify all the genetic variants related to any trait, full understanding of its heritability will not be conquered if we do not face up to the epistatic effects. The authors pointed out that when estimating the explained additive heritability, obtained by $\pi_{\text{explained}} = \text{additive } h_{\text{known}}^2 / \text{additive } h_{\text{all}}^2$, the denominator is estimated indirectly from phenotypic correlations in a population (apparent heritability, h_{pop}^2). In this sense, the “missing heritability” ($1 - \pi_{\text{explained}}$) is calculated by assuming that $h_{\text{all}}^2 = h_{\text{pop}}^2$. However, for traits with genetic and/or gene–environment interactions (which applies to practically all psychiatric phenotypes), h_{pop}^2 significantly exceeds h_{all}^2 . In this case, even when all variants that contribute to the phenotype are identified, the missing heritability will not be zero and will converge to $1 - h_{\text{all}}^2 / h_{\text{pop}}^2$, phenomenon called “phantom heritability.”

The role of gene–gene interactions in several psychiatric phenotypes is well recognized, but the biological underpinnings of this concept have not been sufficiently discussed. We suggest that a major limitation involves the lack of data-driven hypotheses for the study of such epistatic effects. While hypothesis-free whole genome epistatic analyses would require an unrealistic sample size, hypothesis-driven gene–gene inter-

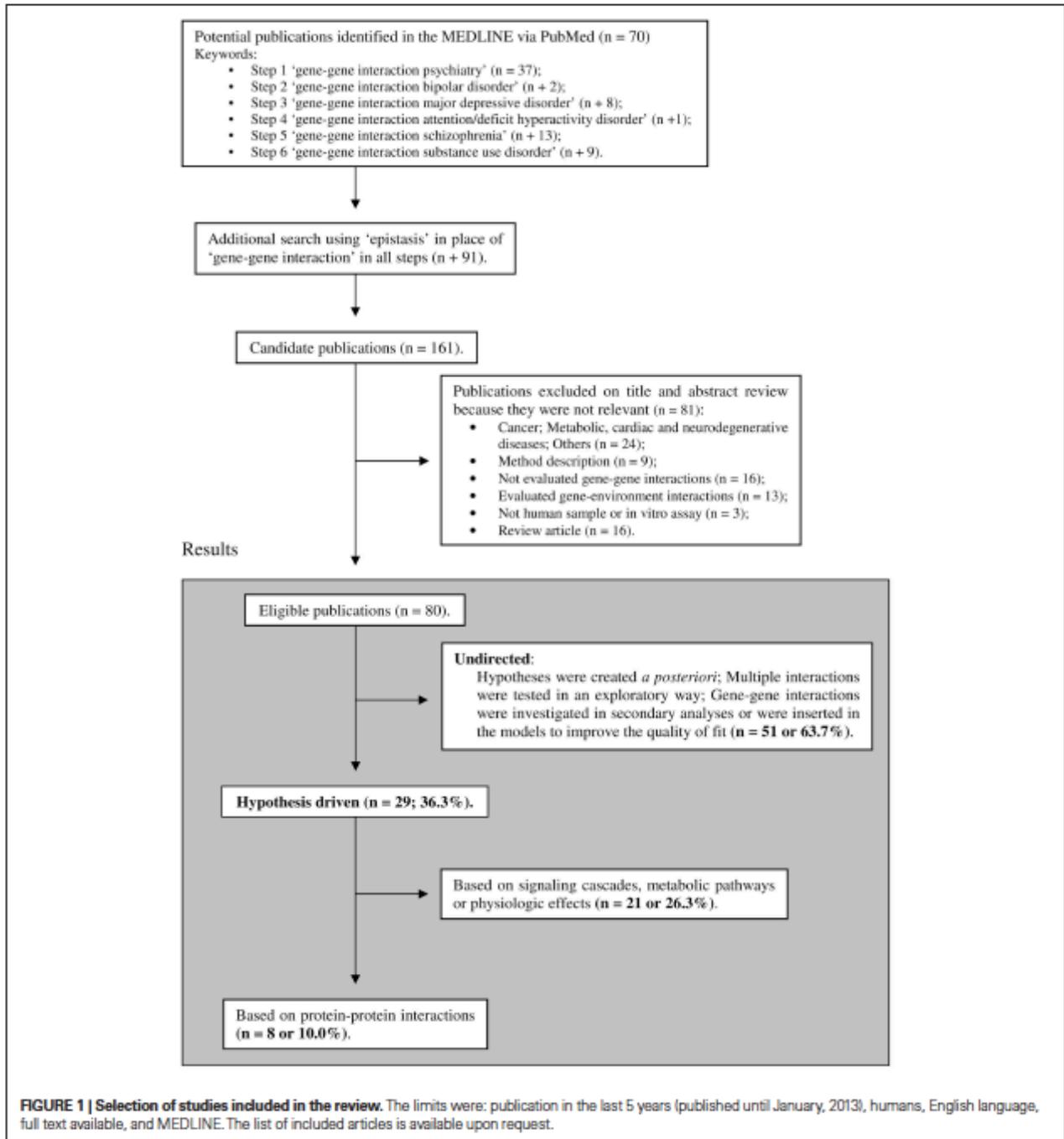
action studies require a reduced number of multiple tests and might help reducing the “phantom heritability.”

Several statistical methods for accessing epistatic effects in genome-wide association studies (GWAS) have been created or improved in the last years (Cowper-Salari et al., 2011; Gyenesei et al., 2012; Pandey et al., 2012; Piriyapongsa et al., 2012; Ma et al., 2013; Pendergrass et al., 2013), but they still fail to provide biological interpretation. One option for this problem is to only test interactions with biological plausibility by implementing semi-exhaustive approaches in GWAS using experimental knowledge of biological networks. By applying this method to the Wellcome Trust Case-Control Consortium data sets, Emily et al. (2009) reduced the number of SNPs pairs inserted in the analysis (1.25×10^{11} to 3.5×10^6) and reported a significant case of epistasis between *PDGFR-B* and *KITLG* genes in susceptibility to bipolar disorder. However, this finding was not replicated yet and it is not supported by experimental data.

On the other hand, *in vitro* and *in vivo* experimental assays, as well as protein modeling and bioinformatic analyses of protein–protein interface are exciting sources of plausible hypothesis for the study of gene–gene interactions in candidate gene association studies. Excellent examples are given by Gonzalez et al. (2012) and Borroto-Escuela et al. (2011). These authors evaluated the heteromerization patterns between two dopamine receptors (DRD2 and DRD4) according to their different isoforms and were able to show that common variants may modulate this process. Based on these data, Mota et al. (2013) have demonstrated, in two independent samples, a significant epistatic effect on the susceptibility of

alcohol dependence that may likely reflect the different heteromerization patterns previously described. Similarly, mineralocorticoid and glucocorticoid receptors (MR and GR) are physically interacting proteins with well characterized functional polymorphisms in their coding genes (*NR3C2* and *NR3C1*, respectively). A MR-GR epistatic effect on nicotine dependence susceptibility (Rovaris et al., 2013) is consistent with the findings of differential heteromerization according to the expression of GR-beta isoform, which is modified by the genetic variation examined.

Despite hypothesis-driven strategies being widely accepted and their advantages well recognized, few empirical studies have applied this approach to address gene–gene interactions. In an intent to clarify the extent to which this approach is neglected in psychiatric genetic studies, we conducted a search on recent MEDLINE-indexed literature (inclusion criteria are shown in Figure 1). This search was designed to sample relevant psychiatric phenotypes and was limited to the last 5 years, period where both GWAS data and functional evidence on genetic polymorphisms became widely available. Although thousands of molecular genetics studies on psychiatric disorders have been published, only 80 gene–gene interaction reports were eligible for analyses according to our inclusion criteria. From the selected 80 studies, 29 (~36%) tested interactions from *a priori* hypotheses and 8 (10%) used data on protein–protein physical interactions (Figure 1). These results suggest that hypothesis-driven gene–gene interaction studies remain a somewhat neglected in psychiatric genetic studies, despite their well recognized potential to increase the explained heritability of psychiatric traits.



The evaluation of hypothesis-driven gene-gene interactions in candidate gene association studies is a novel approach that should be increasingly pursued in neuroscience and psychiatric genetic studies. In this sense, this line of research could even help in the development and improvement of techniques (machine

learning methods, for example) to be applied in GWAS analyses of gene-gene interactions. Some approaches have recently been implemented with this objective in cancer biology and cardiology (Andrew et al., 2012; Ma et al., 2012). Interrelationships of computational statistics and modern molecular biology

could help narrow the gap between "missing" and "phantom" heritabilities in psychiatric genetics.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the following funding sources: CNPq, CAPES, and FAPERGS-DECIT-PPSUS.

REFERENCES

- Andrew, A. S., Hu, T., Gu, J., Gui, J., Ye, Y., Marsit, C. J., et al. (2012). HSD3B and gene-gene interactions in a pathway-based analysis of genetic susceptibility to bladder cancer. *PLoS ONE* 7:e51301. doi: 10.1371/journal.pone.0051301
- Borrotto-Escuela, D. O., Van Craenenbroeck, K., Romero-Fernandez, W., Guidolin, D., Woods, A. S., Rivera, A., et al. (2011). Dopamine D2 and D4 receptor heteromerization and its allosteric receptor-receptor interactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404, 928–934.
- Cowper-Salari, R., Cole, M. D., Karagas, M. R., Lupien, M., and Moore, J. H. (2011). Layers of epistasis: genome-wide regulatory networks and network approaches to genome-wide association studies. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 3, 513–526.
- Emily, M., Mallund, T., Hetn, J., Schauer, L., and Schierup, M. H. (2009). Using biological networks to search for interacting loci in genome-wide association studies. *Eur. J. Hum. Genet.* 17, 1231–1240.
- Gonzalez, S., Rangel-Barajas, C., Peper, M., Lorenzo, R., Moreno, E., Ciruela, F., et al. (2012). Dopamine D4 receptor, but not the ADHD-associated D4.7 variant, forms functional heteromers with the dopamine D2S receptor in the brain. *Mol. Psychiatry* 17, 650–662.
- Gyenesi, A., Moody, J., Laiho, A., Semple, C. A., Haley, C. S., and Wei, W. H. (2012). BiForce Toolbox: powerful high-throughput computational analysis of gene-gene interactions in genome-wide association studies. *Nucleic Acids Res.* 40, W628–W32.
- Ma, L., Brautbar, A., Boerwinkle, E., Sing, C. F., Clark, A. G., and Keinan, A. (2012). Knowledge-driven analysis identifies a gene-gene interaction affecting high-density lipoprotein cholesterol levels in multi-ethnic populations. *PLoS Genet.* 8:e1002714. doi: 10.1371/journal.pgen.1002714
- Ma, L., Clark, A. G., and Keinan, A. (2013). Gene-based testing of interactions in association studies of quantitative traits. *PLoS Genet.* 9:e1003321. doi: 10.1371/journal.pgen.1003321
- Mota, N. R., Rovaris, D. L., Bertuzzi, G. P., Contini, V., Vitola, E. S., Grevet, E. H., et al. (2013). DRD2/DRD4 heteromerization may influence genetic susceptibility to alcohol dependence. *Mol. Psychiatry* 18, 401–402.
- Pandey, A., Davis, N. A., White, B. C., Pajewski, N. M., Savitz, J., Drevets, W. C., et al. (2012). Epistasis network centrality analysis yields pathway replication across two GWAS cohorts for bipolar disorder. *Transl. Psychiatry* 2, e154.
- Pendergrass, S. A., Verma, S. S., Holzinger, E. R., Moore, C. B., Wallace, J., Dudek, S. M., et al. (2013). Next-generation analysis of cataracts: determining knowledge driven gene-gene interactions using biofilter, and gene-environment interactions using the phenx toolkit. *Pac. Symp. Biocomput.* doi: 10.1142/9789814447973_0015
- Pitriyapongsa, J., Ngamphit, C., Intarapanich, A., Kulawongnuchai, S., Assawamakin, A., Bootchai, C., et al. (2012). iLOC: a SNP interaction prioritization technique for detecting epistasis in genome-wide association studies. *BMC Genomics* 13:S2. doi: 10.1186/1471-2164-13-S2-S2
- Rovaris, D. L., Mota, N. R., de, A. zeredo, A., Cupertino, R. B., Bertuzzi, G. P., Polina, E. R., et al. (2013). MR and GR functional SNPs may modulate tobacco smoking susceptibility. *J. Neural Transm.* doi: 10.1007/s00702-013-1012-2. [Epub ahead of print].
- Zuk, O., Hechter, E., Sunyaev, S. R., and Lander, E. S. (2012). The mystery of missing heritability: genetic interactions create phantom heritability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 1193–1198.

Received: 17 March 2013; accepted: 02 May 2013; published online: 16 May 2013.

Citation: Rovaris DL, Mota NR, Callegari-Jacques SM and Bau CHD (2013) Approaching "phantom heritability" in psychiatry by hypothesis-driven gene-gene interactions. *Front. Hum. Neurosci.* 7:210. doi: 10.3389/fnhum.2013.00210

Copyright © 2013 Rovaris, Mota, Callegari-Jacques and Bau. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and subject to any copyright notices concerning any third-party graphics etc.

MR AND GR FUNCTIONAL SNPS MAY MODULATE TOBACCO SMOKING SUSCEPTIBILITY

Journal of Neural Transmission

(Publicado online em 31 de março de 2013)

doi: 10.1007/s00702-013-1012-2

MR and GR functional SNPs may modulate tobacco smoking susceptibility

Diego L. Rovaris · Nina R. Mota · Lucas A. de Azeredo · Renata B. Cupertino ·
Guilherme P. Bertuzzi · Evelise R. Polina · Verônica Contini · Gustavo L. Kortmann ·
Eduardo S. Vitola · Eugenio H. Grevet · Rodrigo Grassi-Oliveira ·
Sidia M. Callegari-Jacques · Claiton H. D. Bau

Received: 28 December 2012 / Accepted: 15 March 2013
© Springer-Verlag Wien 2013

Abstract A number of studies have demonstrated that stress is involved in all aspects of smoking behavior, including initiation, maintenance and relapse. The mineralocorticoid (MR) and glucocorticoid (GR) receptors are expressed in several brain areas and play a key role in negative feedback of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis. As nicotine increases the activation of the HPA axis, we wondered if functional SNPs (single nucleotide polymorphisms) in MR and GR coding genes (*NR3C2* rs5522 and *NR3C1* rs6198, respectively) may be involved in smoking susceptibility. The sample included

627 volunteers, of which 514 were never-smokers and 113 lifetime smokers. We report an interaction effect between rs5522 and rs6198 SNPs. The odds ratio (OR) for the presence of the *NR3C2* rs5522 Val allele in *NR3C1* rs6198 G carriers was 0.18 ($P = 0.007$), while in rs6198 G non-carriers the OR was 1.83 ($P = 0.027$). We also found main effects of the *NR3C1* rs6198 G allele on number of cigarettes smoked per day ($P = 0.027$) and in total score of the Fagerström Test for Nicotine Dependence ($P = 0.007$). These findings are consistent with a possible link between *NR3C2* and *NR3C1* polymorphisms and smoking behavior and provide a first partial replication for a nominally significant GWAS finding between *NR3C2* and tobacco smoking.

Keywords Smoking · Stress · Mineralocorticoid receptor · Glucocorticoid receptor · Gene–gene interaction

D. L. Rovaris · N. R. Mota · L. A. de Azeredo ·
R. B. Cupertino · G. P. Bertuzzi · E. R. Polina ·
G. L. Kortmann · S. M. Callegari-Jacques · C. H. D. Bau (✉)
Department of Genetics, Instituto de Biociências,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento
Gonçalves - 15053, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil
e-mail: claiton.bau@ufrgs.br

D. L. Rovaris · N. R. Mota · E. S. Vitola · E. H. Grevet
ADHD Outpatient Program, Adult Division, Hospital de Clínicas
de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

V. Contini
Postgraduate Program in Biotechnology, Centro Universitário
UNIVATES, Lajeado, Brazil

R. Grassi-Oliveira
Centre for Traumatic Stress Studies and Research (NEPTE),
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, Brazil

S. M. Callegari-Jacques
Department of Statistics, Instituto de Matemática, Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Introduction

Preclinical and neuroimaging studies showing that cortisol increases the release of dopamine in mesocorticolimbic pathways are consistent with a relationship between stress and addiction (Oswald et al. 2005; Sinha 2008; Wand et al. 2007). Although cortisol release is a way for the body to protect itself from a perceived stressor, prolonged or inappropriate exposure to this hormone may be a risk factor for several diseases, including substance use disorders (DeRijk 2009; Joels et al. 2008; Richards et al. 2011). In the case of tobacco smoking, acute and chronic stress are related with multiple stages of addiction including initiation (Wills et al. 2002), maintenance (McEwen et al. 2008) and relapse (al'Absi et al. 2005; Falba et al. 2005). It is well recognized that nicotine stimulates secretion of

corticosteroids in a dose-dependent manner (Bruijnzeel 2012; Lutfy et al. 2012; Mendelson et al. 2005), but results of the association between smoking status and cortisol levels have been discrepant (Gilbert et al. 1992; Kirschbaum et al. 1992; Mendelson et al. 2005; Mendelson et al. 2008; Steptoe and Ussher 2006; Wilkins et al. 1982; Wintemitz and Quillen 1977).

High levels of cortisol induce negative feedback in the brain by the activation of both mineralocorticoid (MR) and glucocorticoid receptors (GR). The MR and GR coding genes (*NR3C2* and *NR3C1*, respectively) are expressed in several brain areas and some of their single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been intensively studied in relation to the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis reactivity. One of the most studied SNP in the *NR3C2* gene is a G→A substitution in the second exon, which results in an amino acid change (Ile180Val; rs5522). The Val allele has been associated to lower efficiency in using cortisol as ligand (Arai et al. 2003; DeRijk et al. 2006; van Leeuwen et al. 2011) and increased salivary and plasma cortisol responses to a psychosocial stressor and dexamethasone suppression test (DeRijk et al. 2006; van Leeuwen et al. 2010). A nominal association between the Val allele and the number of smoked cigarettes per day was found through genome-wide association study (GWAS) (Berrettini et al. 2008).

GRs are expressed in two main isoforms, GR α and GR β , generated by alternative splicing of the *NR3C1* gene. The *NR3C1* rs6198 (A→G) is a well-studied SNP that alters the rates of GR α /GR β expression, where G allele favors the expression of the GR β isoform. The GR β is unable to bind cortisol and acts as a dominant negative inhibitor of the classic GR α isoform (DeRijk et al. 2001; Oakley and Cidlowski 2011). G allele carriers have shown significant higher cortisol responses following the psychological stressor and dexamethasone suppression test (Kumsta et al. 2007, 2008) and an association with major depressive disorder has already been demonstrated (Szczechankiewicz et al. 2011). However, as far as we know, no genetic association studies on smoking behaviors included the *NR3C1* rs6198 SNP. An association of another *NR3C1* SNP (rs41423247—BclII) with susceptibility to nicotine dependence and heavy smoking was reported (Rogausch et al. 2007), but not replicated in a subsequent study (Siiskonen et al. 2009).

Taking into account the links between HPA axis and tobacco smoking and the evidence that the *NR3C2* rs5522 and the *NR3C1* rs6198 SNPs influence HPA axis reactivity, we hypothesized that these variants could play a significant role on smoking susceptibility. We also attempted to replicate the previous nominally significant association between rs5522 in smoking behavior found in a GWAS (Berrettini et al. 2008).

Methods

Sample

A total of 627 unrelated subjects (311 males) of European descent were recruited in the blood donation center of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil. A protocol assessing sociodemographic data was applied for all subjects enrolled in this study. Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) was evaluated with the Adult ADHD Self-Report Scale screener—ASRS-v1.1 (Kessler et al. 2005) and other psychiatric diagnoses with the Structured Clinical Interview for DSM-IV screening module—SCID-I/P for the Axis I psychiatric disorders (First et al. 2002). Since our group has several studies on the genetics of ADHD among adults (e.g. Contini et al. 2012), this sample was collected to be a control group for those studies and therefore ADHD diagnosis is an exclusion criteria, in addition to non-European descent.

The criterion for lifetime smoking was current or past daily use of tobacco for at least 1 month. Daily smoking is strongly related to nicotine dependence, since it usually starts when dependence is already established (Mayhew et al. 2000; Polina et al. 2009; Wellman et al. 2004). The Fagerström Test for Nicotine Dependence (FTND) that is widely used to evaluate the severity of nicotine dependence was applied. 113 participants were classified as lifetime smokers and 514 as never-smokers. All participants signed an informed consent approved by the Ethics Committee of the HCPA.

Laboratory methods

DNA was extracted from peripheral blood by the salting out method (Lahiri and Numberger 1991). The *NR3C2* rs5522 and *NR3C1* rs6198 SNPs (also known as Ile180Val and A3669G, respectively) were genotyped using the TaqMan SNP genotyping assays (C_12007869_20 and C_8951023_10, respectively) according to the manufacturer's recommended protocol (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Statistical analysis

Binary logistic regression was used to evaluate the effect of the presence of *NR3C2* rs5522 Val and *NR3C1* rs6198 G alleles on the susceptibility to tobacco smoking, considering also confounding effects. Categorical variables (such as gender, generalized anxiety disorder and major depression disorder) were tested through stratified analyses using the Mantel–Haenszel method. A confounding effect was considered when the difference between the OR Mantel–Haenszel and crude OR was greater than 20 %. Interaction

terms between independent categorical variables were incorporated in the logistic regression model if the *P* value for homogeneity of ORs was <0.2 in the Mantel–Haenszel analyses. For continuous variables (such as age and years of schooling) the Mann–Whitney test was used and a *P* value of 0.2 was established and utilized as threshold for inclusion as covariate in the model (association with the outcome and SNPs).

A multivariate analysis of covariance (MANCOVA) was used to test the SNPs influence on smoking severity, as measured by the number of smoked cigarettes per day and FTND score. A *P* value ≤ 0.05 was considered statistically significant on two-tailed testing for all analyses.

Results

Genotypic, psychiatric and socio-demographic characteristics of the sample are presented in Table 1. The genotype distribution of SNPs was compatible with Hardy–Weinberg expectations and similar to that previously reported for other European or European-derived samples (Bouma et al. 2011; Klok et al. 2011).

The binary logistic regression tested the main effects of the *NR3C2* rs5522 and *NR3C1* rs6198 SNPs and an interaction term between them (test of homogeneity of the ORs, $P < 0.05$). Age was included in the models, but years of schooling, gender, generalized anxiety disorder and major depression disorder did not reach the confounding effect threshold. Gender–SNP interaction terms were not included in the logistic regression since there was no significant heterogeneity of ORs ($P > 0.3$) in the stratified Mantel–Haenszel analyses.

The logistic regression (Table 2) revealed a significant interaction effect between the risk alleles of the *NR3C2* rs5522 and *NR3C1* rs6198 SNPs (Table 2). The presence of the *NR3C2* rs5522 Val allele in *NR3C1* rs6198 G carriers was associated with protection against tobacco smoking (OR = 0.18; 95 % CI: 0.05–0.63; $P = 0.007$), while the presence of the *NR3C2* rs5522 Val allele in *NR3C1* rs6198 G noncarriers conferred risk to smoking (OR = 1.83; 95 % CI: 1.07–3.15; $P = 0.027$). A risk trend was found for the presence of the *NR3C1* rs6198 G allele in *NR3C2* rs5522 Val noncarriers (OR = 1.61; 95 % CI: 0.96–2.68; $P = 0.070$). In the total sample, no main effects of both rs5522 and rs6198 were detected (Table 2).

The MANCOVA analysis indicated that *NR3C1* rs6198 G allele carriers present a higher number of smoked cigarettes per day ($P = 0.024$) and a higher FTND score ($P = 0.007$) when compared to A homozygotes (Table 3). Since the FTND score distribution does not resemble a normal curve, a Mann–Whitney test was employed to confirm this effect ($Z = -2.58$; $P = 0.010$).

Table 1 Characteristics of participants

	Never-smokers (<i>n</i> = 514)	Lifetime smokers (<i>n</i> = 113)	<i>P</i> value
Males	253 (49.2)	58 (51.3)	0.755
Age (years)	28.5 (8.3)	32.1 (9.7)	0.001
Schooling (years)	13.3 (2.9)	12.7 (3.5)	0.158
Generalized anxiety disorder	50 (9.7)	14 (12.5)	0.161
Major depressive disorder	135 (26.3)	37 (33.0)	0.391
Minor allele and genotype frequencies			
GR rs6198			
G allele	0.162	0.168	0.070/
AA	0.707	0.714	0.224*
AG	0.247	0.249	
GG	0.046	0.037	
MR rs5522			
Val allele	0.118	0.141	0.788/
Ile/Ile	0.776	0.734	0.370*
Ile/Val	0.208	0.256	
Val/Val	0.016	0.010	

Data are mean and (standard deviation) or *n* and (%)

GR glucocorticoid receptor, MR mineralocorticoid receptor

* *P* value for Hardy–Weinberg equilibrium (never-smokers and lifetime smokers, respectively)

Discussion

The results of this study are in agreement with a role of HPA axis variation on lifetime smoking. A new and interesting finding was the interaction effect between the *NR3C2* and *NR3C1* genes. In addition, the G allele of *NR3C1* rs6198 was associated with severity of nicotine dependence. Although these SNPs have been consistently associated with psychiatric phenotypes (Fortier et al. 2013; Klok et al. 2011; Kortmann et al. 2012; Kuningas et al. 2007; Spijker et al. 2009; Spijker et al. 2011; Szczepankiewicz et al. 2011), there is only one previous nominal association signal between *NR3C2* rs5522 and smoking behavior (Berrettini et al. 2008).

Other psychiatric genetic findings should be considered in the interpretation of the role of *NR3C2* rs5522 and tobacco smoking. Carriers of the Val allele with ADHD demonstrated higher inattention, hyperactivity/impulsivity and impairment scores (Kortmann et al. 2012). It is well established that ADHD is a risk factor to smoking (Biederman et al. 2006; Kollins et al. 2005; Sousa et al. 2011). In this sense, our results are suggestive of a pleiotropic effect of this polymorphism since none of the included individual had ADHD diagnoses. Additionally, Val carriers have shown reduced ability to modulate behavior as a function of reward when facing a stressor, while in

Table 2 Multiple logistic regression analysis of the influence of *NR3C2* (MR) and *NR3C1* (GR) polymorphisms on tobacco smoking susceptibility

	B	SE	Wald	df	OR (CI 95 %) ^a	P-value
Main effect of MR rs5522 in the total sample						
Ile/Ile	0	–			1	–
Ile/Val + Val/Val	0.19	0.24	0.59	1	1.20 (0.75–1.9)	0.442
Main effect of GR rs6198 in the total sample						
AA	0	–			1	–
AG + GG	0.10	0.23	0.18	1	1.10 (0.70–1.74)	0.672
rs5522-rs6198 interaction						
Presence of rs5522-Val allele in rs6198-G carriers	–1.71	0.63	7.26	1	0.18 (0.05–0.63)	0.007
Presence of rs5522-Val allele in rs6198-G noncarriers	0.61	0.28	4.87	1	1.83 (1.07–3.15)	0.027
Presence of rs6198-G allele in rs5522-Val noncarriers	0.47	0.26	3.29	1	1.61 (0.96–2.68)	0.070

Hosmer and Lemeshow goodness-of-fit test, $P = 0.890$

GR glucocorticoid receptor, MR mineralocorticoid receptor, SE standard error, df degrees of freedom, OR odds ratio, CI confidence interval

^a Adjusted for age

Table 3 Influence of *NR3C2* (MR) and *NR3C1* (GR) SNPs on cigarettes per day and FTND score (MANCOVA analysis)

	Cigarettes per day	F test	df	P Value	FTND score	F test	df	P Value
MR rs5522								
Ile/Ile ($n = 76$)	15.3 (1.2)	0.23	1	0.633*	2.5 (0.3)	0.05	1	0.823*
Val carriers ($n = 26$)	16.8 (3.0)				2.7 (0.7)			
GR rs6198								
AA ($n = 73$)	12.3 (1.2)	5.24	1	0.024	1.6 (0.3)	7.53	1	0.007
G carriers ($n = 29$)	20.0 (2.9)				3.6 (0.7)			
rs5522-rs6198 interaction								
Ile/Ile-AA ($n = 50$)	12.9 (1.4)	0.68	1	0.413*	1.9 (0.3)	1.33	1	0.251*
Ile/Ile-G carriers ($n = 26$)	17.6 (1.9)				3.1 (0.4)			
Val carriers-AA ($n = 23$)	11.8 (2.0)				1.3 (0.4)			
Val carriers-G carriers ($n = 3$)	21.8 (5.7)				4.1 (1.2)			

In this analysis the sample size is smaller ($n = 102$)

Mean and (standard error); Age was a covariate

GR glucocorticoid receptor, MR mineralocorticoid receptor, FTND the Fagerström test for nicotine dependence, df degrees of freedom

* Power observed was <0.4

no-stress conditions reward learning was enhanced (Bogdan et al. 2010). Several psychiatric phenotypes, including addiction, are characterized by reward dysfunction (Barr et al. 2008; Diekhof et al. 2008).

NR3C1 rs6198 SNP results in a remarkably well-characterized functional effect (DeRijk et al. 2001; Oakley and Cidlowski 2011) and previous studies have already linked the G allele with altered cortisol response (Kumsta et al. 2007, Kumsta et al. 2008) and depression (Szczeplankiewicz et al. 2011) that are risk factors to tobacco smoking (Jamal et al. 2011; Khaled et al. 2012; Richards et al. 2011). However, to our knowledge, this is the first report directly showing an association between the *NR3C1* rs6198 G allele and smoking behavior.

Our study also provided preliminary evidence for the interaction effect between two stress-response genes. At the molecular level, MR and GR may physically interact to form heteromers with distinct transactivation properties (Liu et al. 1995; Savory et al. 2001; Trapp et al. 1994). Furthermore, a MR/GR balance hypothesis suggests that inadequate operation of one of these receptors may influence the risk for stress-related diseases (Joels et al. 2008; Oitzl et al. 2010). Our findings point to a protective effect conferred by the simultaneous presence of *NR3C2* rs5522 Val and *NR3C1* rs6198 G alleles, consistent with the inhibiting effect of the GR β isoform (increased by the G allele) (Bamberger et al. 1997) over the HPA disruptive Val allele (DeRijk 2009).

Although the *NR3C2* rs5522 was nominally associated with the number of cigarettes smoked per day in a GWAS (Berrettini et al. 2008), we could partially replicate this finding only in terms of smoking status. The possibility of type 2 error cannot be discarded, since our sample size allowed for a power of only 40 % in the MANCOVA analysis on severity of nicotine dependence (observed power of the general linear model output). Statistical power could also be an issue since presence of susceptible individuals in the group of never-smokers cannot be ruled out. However, the latest survey on the smoking situation in Brazil (INCA 2011) showed that 80 % of smokers start smoking behavior before 20 years. As the average age of our group of never-smokers was 28 years, we consider unlikely that these individuals could represent a bias. In order to avoid the risk of false positive results due to multiple comparisons, we used multivariate analysis and controlled the rate of experimental error by analyzing the number of cigarettes smoked per day and FTND scores simultaneously by MANCOVA. In addition, only a dominant genetic model was tested in the binary logistic regression analyses due the small frequency of Val/Val (rs5522) and GG (rs6198) homozygotes (~1.5 %). We acknowledge the limited sample size of our smoking group; we think this data should be considered for inclusion in future meta-analysis on the HPA axis genes and smoking behaviors. Another limitation of this study is that we did not evaluate ACTH and cortisol levels. Future studies might explore the relationships between SNPs related to HPA axis, cortisol response and severity of nicotine dependence.

In conclusion, several lines of evidence have addressed the association between stress and tobacco smoking, but to the best of our knowledge we are the first to demonstrate significant epistatic interaction between two stress-response genes on smoking susceptibility. These results point to the need for further studies specifically designed to clarify the suggested effects of *NR3C2* and *NR3C1* genes on addiction.

Acknowledgments This work was supported by the following funding sources: CNPq, CAPES and FAPERGS-DECT-PPSUS. We are thankful to Prof. Paulo Belmonte-de-Abreu and Prof. Luis A. Rohde for providing administrative support in the Psychiatry Service of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Conflict of interest The authors have no biomedical financial interests or potential conflicts of interest to declare.

References

- al' Absi M, Hatsukami D, Davis GL (2005) Attenuated adrenocorticotrophic responses to psychological stress are associated with early smoking relapse. *Psychopharmacology* 181(1):107–117
- Arai K, Nakagomi Y, Iketani M, Shimura Y, Amemiya S, Ohyama K et al (2003) Functional polymorphisms in the mineralocorticoid receptor and amiloride-sensitive sodium channel genes in a patient with sporadic pseudohypoaldosteronism. *J Hum Genet* 112(1):91–97
- Bamberger CM, Bamberger AM, Wald M, Chrousos GP, Schulte HM (1997) Inhibition of mineralocorticoid activity by the beta-isoform of the human glucocorticoid receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 60(1–2):43–50
- Barr RS, Pizzagalli DA, Culhane MA, Goff DC, Evins AE (2008) A single dose of nicotine enhances reward responsiveness in nonsmokers: implications for development of dependence. *Biol Psychiatry* 63(11):1061–1065
- Berrettini W, Yuan X, Tozzi F, Song K, Francks C, Chilcoat H et al (2008) Alpha-5/alpha-3 nicotinic receptor subunit alleles increase risk for heavy smoking. *Mol Psychiatry* 13(4):368–373
- Biederman J, Monuteaux MC, Mick E, Spencer T, Wilens TE, Silva JM et al (2006) Young adult outcome of attention deficit hyperactivity disorder: a controlled 10-year follow-up study. *Psychol Med* 36(2):167–179
- Bogdan R, Perlis RH, Fagerness J, Pizzagalli DA (2010) The impact of mineralocorticoid receptor ISO/VAL genotype (rs5522) and stress on reward learning. *Genes Brain Behav* 9(6):658–667
- Bouma EM, Riese H, Nolte IM, Oosterom E, Verhulst FC, Ormel J et al (2011) No associations between single nucleotide polymorphisms in corticoid receptor genes and heart rate and cortisol responses to a standardized social stress test in adolescents: the TRAILS study. *Behav Genet* 41(2):253–261
- Bruijnzeel AW (2012) Tobacco addiction and the dysregulation of brain stress systems. *Neurosci Biobehav Rev* 36(5):1418–1441
- Contini V, Victor MM, Bertuzzi GP, Salgado CA, Picon FA, Grevet EH et al (2012) No significant association between genetic variants in 7 candidate genes and response to methylphenidate treatment in adult patients with ADHD. *J Clin Psychopharmacol* 32(6):820–823
- DeRijk RH (2009) Single nucleotide polymorphisms related to HPA axis reactivity. *Neuroimmunomodulation* 16(5):340–352
- DeRijk RH, Schaaf MJ, Turner G, Datson NA, Vreugdenhil E, Cidlowski J et al (2001) A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the glucocorticoid receptor beta-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 28(11):2383–2388
- DeRijk RH, Wust S, Meijer OC, Zennaro MC, Federenko IS, Hellhammer DH et al (2006) A common polymorphism in the mineralocorticoid receptor modulates stress responsiveness. *J Clin Endocrinol Metab* 91(12):5083–5089
- Diekhof EK, Falkai P, Gruber O (2008) Functional neuroimaging of reward processing and decision-making: a review of aberrant motivational and affective processing in addiction and mood disorders. *Brain Res Rev* 59(1):164–184
- Falba T, Teng HM, Sindelar JL, Gallo WT (2005) The effect of involuntary job loss on smoking intensity and relapse. *Addiction* 100(9):1330–1339
- First MB, Spitzer RL, Gibbon M, Williams JBW (2002) Structured Clinical Interview for DSM-IV-TR Axis I Disorders, Research Version, Patient Edition (SCID-I/P). Biometrics Research, New York State Psychiatric Institute, New York
- Fortier ME, Sengupta SM, Grizenko N, Choudhry Z, Thakur G, Joobar R (2013) Genetic evidence for the association of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis with ADHD and methylphenidate treatment response. *Neuromol Med* 15(1):122–132
- Gilbert DG, Meliska CJ, Williams CL, Jensen RA (1992) Subjective correlates of cigarette-smoking-induced elevations of peripheral beta-endorphin and cortisol. *Psychopharmacology* 106(2):275–281

- INCA (2011) A situação do tabagismo no Brasil: dados dos inquéritos do Sistema Internacional de Vigilância, da Organização Mundial da Saúde, realizados no Brasil, entre 2002 e 2009/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. INCA, Rio de Janeiro
- Jamal M, Does AJ, Penninx BW, Cuijpers P (2011) Age at smoking onset and the onset of depression and anxiety disorders. *Nicotine Tob Res* 13(9):809–819
- Joels M, Karst H, DeRijk R, de Kloet ER (2008) The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. *Trends Neurosci* 31(1):1–7
- Kessler RC, Adler L, Ames M, Demler O, Faraone S, Hiripi E et al (2005) The World Health Organization Adult ADHD Self-Report Scale (ASRS): a short screening scale for use in the general population. *Psychol Med* 35(2):245–256
- Khaled SM, Bulloch AG, Williams JV, Hill JC, Lavorato DH, Patten SB (2012) Persistent heavy smoking as risk factor for major depression (MD) incidence—evidence from a longitudinal Canadian cohort of the National Population Health Survey. *J Psychiatr Res* 46(4):436–443
- Kirschbaum C, Wust S, Strasburger CJ (1992) 'Normal' cigarette smoking increases free cortisol in habitual smokers. *Life Sci* 50(6):435–442
- Klok MD, Vreburg SA, Penninx BW, Zitman FG, de Kloet ER, DeRijk RH (2011) Common functional mineralocorticoid receptor polymorphisms modulate the cortisol awakening response: interaction with SSRIs. *Psychoneuroendocrinology* 36(4):484–494
- Kollins SH, McClemon FJ, Fuemmeler BF (2005) Association between smoking and attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms in a population-based sample of young adults. *Arch Gen Psychiatry* 62(10):1142–1147
- Kortmann GL, Contini V, Bertuzzi GP, Mota NR, Rovaris DL, Paixao-Cortes VR et al (2012) The role of a mineralocorticoid receptor gene functional polymorphism in the symptom dimensions of persistent ADHD. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. doi:10.1007/s00406-012-0321-z
- Kumsta R, Entringer S, Koper JW, van Rossum EF, Hellhammer DH, Wust S (2007) Sex specific associations between common glucocorticoid receptor gene variants and hypothalamus-pituitary-adrenal axis responses to psychosocial stress. *Biol Psychiatry* 62(8):863–869
- Kumsta R, Entringer S, Koper JW, van Rossum EF, Hellhammer DH, Wust S (2008) Glucocorticoid receptor gene polymorphisms and glucocorticoid sensitivity of subdermal blood vessels and leukocytes. *Biol Psychol* 79(2):179–184
- Kuningas M, de Rijk RH, Westendorp RG, Jolles J, Slagboom PE, van Heemst D (2007) Mental performance in old age dependent on cortisol and genetic variance in the mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *Neuropsychopharmacology* 32(6):1295–1301
- Lahiri DK, Numberger JI (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19(19):5444
- Liu W, Wang J, Sauter NK, Pearce D (1995) Steroid receptor heterodimerization demonstrated in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(26):12480–12484
- Lutfy K, Aimiwu O, Mangubat M, Shin CS, Nerio N, Gomez R et al (2012) Nicotine stimulates secretion of corticosterone via both CRH and AVP receptors. *J Neurochem* 120(6):1108–1116
- Mayhew KP, Flay BR, Mott JA (2000) Stages in the development of adolescent smoking. *Drug Alcohol Depend* 59(Suppl 1):S61–S81
- McEwen A, West R, McRobbie H (2008) Motives for smoking and their correlates in clients attending Stop Smoking treatment services. *Nicotine Tob Res* 10(5):843–850
- Mendelson JH, Sholar MB, Goletiani N, Siegel AJ, Mello NK (2005) Effects of low- and high-nicotine cigarette smoking on mood states and the HPA axis in men. *Neuropsychopharmacology* 30(9):1751–1763
- Mendelson JH, Goletiani N, Sholar MB, Siegel AJ, Mello NK (2008) Effects of smoking successive low- and high-nicotine cigarettes on hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormones and mood in men. *Neuropsychopharmacology* 33(4):749–760
- Oakley RH, Cidlowski JA (2011) Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J Biol Chem* 286(5):3177–3184
- Oitzl MS, Champagne DL, van der Veen R, de Kloet ER (2010) Brain development under stress: hypotheses of glucocorticoid actions revisited. *Neurosci Biobehav Rev* 34(6):853–866
- Oswald LM, Wong DF, McCaul M, Zhou Y, Kuwabara H, Choi L et al (2005) Relationships among ventral striatal dopamine release, cortisol secretion, and subjective responses to amphetamine. *Neuropsychopharmacology* 30(4):821–832
- Polina ER, Contini V, Hutz MH, Bau CH (2009) The serotonin 2A receptor gene in alcohol dependence and tobacco smoking. *Drug Alcohol Depend* 101(1–2):128–131
- Richards JM, Stépelman BA, Bornovalova MA, Daughters SB, Sinha R, Lejuez CW (2011) Biological mechanisms underlying the relationship between stress and smoking: state of the science and directions for future work. *Biol Psychol* 88(1):1–12
- Rogausch A, Kochen MM, Meineke C, Hennig J (2007) Association between the BclII glucocorticoid receptor polymorphism and smoking in a sample of patients with obstructive airway disease. *Addict Biol* 12(1):93–99
- Savory JG, Prefontaine GG, Lamprecht C, Liao M, Walther RF, Lefebvre YA et al (2001) Glucocorticoid receptor homodimers and glucocorticoid-mineralocorticoid receptor heterodimers form in the cytoplasm through alternative dimerization interfaces. *Mol Cell Biol* 21(3):781–793
- Siskonen SJ, Visser LE, Tiemeier H, Hofman A, Lamberts SW, Uitterlinden AG et al (2009) BclII glucocorticoid receptor polymorphism and smoking in the general population. *Addict Biol* 14(3):349–355
- Sinha R (2008) Chronic stress, drug use, and vulnerability to addiction. *Ann N Y Acad Sci* 1141:105–130
- Sousa NO, Grevet EH, Salgado CA, Silva KL, Victor MM, Karam RG et al (2011) Smoking and ADHD: an evaluation of self medication and behavioral disinhibition models based on comorbidity and personality patterns. *J Psychiatr Res* 45(6): 829–834
- Spijker AT, van Rossum EF, Hoencamp E, DeRijk RH, Haffmans J, Blom M et al (2009) Functional polymorphism of the glucocorticoid receptor gene associates with mania and hypomania in bipolar disorder. *Bipolar Disord* 11(1):95–101
- Spijker AT, Giltay EJ, van Rossum EF, Manenschijs L, DeRijk RH, Haffmans J et al (2011) Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor polymorphisms and clinical characteristics in bipolar disorder patients. *Psychoneuroendocrinology* 36(10):1460–1469
- Stęptoe A, Ussher M (2006) Smoking, cortisol and nicotine. *Int J Psychophysiol* 59(3):228–235
- Szczepankiewicz A, Leszczynska-Rodziewicz A, Pawlak J, Rajewska-Rager A, Dmitrzak-Weglarczyk M, Wilkosz M et al (2011) Glucocorticoid receptor polymorphism is associated with major depression and predominance of depression in the course of bipolar disorder. *J Affect Disord* 134(1–3):138–144
- Trapp T, Rupprecht R, Castren M, Reul JM, Holsboer F (1994) Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptor: a new principle of glucocorticoid action in the CNS. *Neuron* 13(6):1457–1462
- van Leeuwen N, Kumsta R, Entringer S, de Kloet ER, Zitman FG, DeRijk RH et al (2010) Functional mineralocorticoid receptor (MR) gene variation influences the cortisol awakening response after dexamethasone. *Psychoneuroendocrinology* 35(3): 339–349

- van Leeuwen N, Bellingrath S, de Kloet ER, Zitman FG, DeRijk RH, Kudielka BM et al (2011) Human mineralocorticoid receptor (MR) gene haplotypes modulate MR expression and transactivation: implication for the stress response. *Psychoneuroendocrinology* 36(5):699–709
- Wand GS, Oswald LM, McCaul ME, Wong DF, Johnson E, Zhou Y et al (2007) Association of amphetamine-induced striatal dopamine release and cortisol responses to psychological stress. *Neuropsychopharmacology* 32(11):2310–2320
- Wellman RJ, DiFranza JR, Savageau JA, Dussault GF (2004) Short term patterns of early smoking acquisition. *Tob Control* 13(3): 251–257
- Wilkins JN, Carlson HE, Van Vunakis H, Hill MA, Gritz E, Jarvik ME (1982) Nicotine from cigarette smoking increases circulating levels of cortisol, growth hormone, and prolactin in male chronic smokers. *Psychopharmacology* 78(4):305–308
- Wills TA, Sandy JM, Yaeger AM (2002) Stress and smoking in adolescence: a test of directional hypotheses. *Health Psychol* 21(2):122–130
- Wintemitz WW, Quillen D (1977) Acute hormonal response to cigarette smoking. *J Clin Pharmacol* 17(7):389–397

ANEXO III

PRODUÇÃO CIENTÍFICA ADICIONAL NO PERÍODO DO DOUTORADO

The role of a mineralocorticoid receptor gene functional polymorphism in the symptom dimensions of persistent ADHD

Gustavo Lucena Kortmann · Verônica Contini · Guilherme Pinto Bertuzzi · Nina Roth Mota ·
Diego Luiz Rovaris · Vanessa Rodrigues Paixão-Côrtes · Leandro Leal de Lima ·
Eugenio Horacio Grevet · Carlos Alberto Iglesias Salgado · Eduardo Schneider Vitola ·
Luis Augusto Rohde · Paulo Belmonte-de-Abreu · Claiton Henrique Dotto Bau

Received: 1 September 2011 / Accepted: 25 April 2012 / Published online: 15 May 2012
© Springer-Verlag 2012

The role of a lifetime history of oppositional defiant and conduct disorders in adults with ADHD: implications for clinical practice

Eduardo S. Vitola,^{1,2} Carlos A. I. Salgado,^{1,2} Katiane L. Silva,^{1,2} Rafael G. Karam,^{1,2}
Marcelo M. Victor,^{1,2} Nina R. Mota,^{1,3} Verônica Contini,^{1,2,3} Felipe A. Picon,^{1,2}
Paula O. Guimarães-da-Silva,^{1,2} Rafael S. Giordani,¹ Luis A. Rohde,^{1,2}
Paulo Belmonte-de-Abreu,^{1,2} Claiton H. D. Bau,^{1,3*} and Eugenio H. Grevet^{1,2}

Cognitive Deficits in Adults With ADHD Go Beyond Comorbidity Effects

Journal of Attention Disorders
XX(X) 1–6
© 2012 SAGE Publications
Reprints and permission:
sagepub.com/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1087054711434155
<http://jad.sagepub.com>


Katiane L. Silva¹, Paula O. Guimarães-da-Silva¹, Eugenio H. Grevet¹,
Marcelo M. Victor¹, Carlos A. I. Salgado¹, Eduardo S. Vitola¹, Nina R. Mota²,
Aline G. Fischer¹, Verônica Contini², Felipe A. Picon¹, Rafael G. Karam¹,
Paulo Belmonte-de-Abreu¹, Luis A. Rohde¹, and Claiton H. D. Bau²

Journal of Psychiatric Research 46 (2012) 1307–1311



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Psychiatric Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/psychires



Does age of onset of impairment impact on neuropsychological and personality features of adult ADHD?

Paula O. Guimarães-da-Silva^a, Katiane L. Silva^a, Eugenio H. Grevet^a, Carlos A.I. Salgado^a,
Rafael G. Karam^a, Marcelo M. Victor^a, Eduardo S. Vitola^a, Nina R. Mota^b, Aline G. Fischer^a,
Felipe A. Picon^a, Guilherme P. Bertuzzi^b, Evelise R. Polina^b, Luis A. Rohde^a, Paulo Belmonte-de-Abreu^a,
Claiton H.D. Bau^{a,b,*}

^aADHD Outpatient Program – Adult Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

^bDepartment of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil