

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**Os caminhos do neurodesenvolvimento:  
abordagem multifacetada na identificação de perfis de  
heterogeneidade clínica e genética no TDAH e Autismo**

**DJENIFER KAPPEL**

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

Orientador: Prof. Dr. Claiton Henrique Dotto Bau

Co-orientador: Dr. Oscar Lao Grueso

Porto Alegre, Dezembro de 2020

## Instituições e Fontes Financiadoras

A presente Tese de Doutorado foi desenvolvida no Laboratório de Genética Humana Molecular no Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). A aluna recebeu bolsa de estudos concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 148273/2016-5). Parte dessa Tese foi desenvolvida no *Centre Nacional d'Anàlisi Genòmica* - CNAG-CRG, em Barcelona, na Espanha (fomentado pelo Programa *Horizon 2020* da União Europeia, H2020 - 643051 MiND).

Para a realização desse trabalho, recebemos fomento de instituições governamentais, em específico do CNPq (466722/2014-1; 424041/2016-2; 426905/2016-2; 431472/2018-1; 140853/2019-7), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES - 001, Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre FIPE-HCPA 160600, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – FAPERGS (Programa Pesquisa para o SUS- PPSUS- 19/2551-0001668-9 e 19/2551-0001731-6).

## Agradecimentos

Obter um doutorado e principalmente escrever uma Tese pode parecer um esforço extremamente solitário, agravado em mil vezes em meio a uma pandemia. No entanto, certamente não cheguei até aqui sozinha. E por isso eu gostaria de expressar o quanto sou grata por todos os amigos, familiares, colegas de trabalho e outras pessoas que estiveram ao meu redor durante estes últimos anos ajudando direta ou indiretamente nesta tarefa.

À UFRGS e ao PPGBM, minha segunda casa por 10 anos. Sou muito grata pela formação de qualidade! Em especial, gostaria de agradecer ao Claiton por ter me transmitido toda a sua paixão pela pesquisa da genética psiquiátrica. Por ter tido confiança no meu trabalho, inclusive nas constantes reviravoltas das minhas decisões científicas.

Muito obrigado ao Oscar, que me acolheu em seu grupo e sempre me encorajou a ser a minha versão mais independente.

À Nina, só tenho mais uma vez a agradecer por ter sido minha mentora, por sempre pensar na minha carreira como uma extensão da tua. Obrigada por ter trilhado o caminho!

O meu mais sincero obrigado à Matilha – Bruna, Cibele, Diana, Duda, Diego, Eduarda, Jaque, Nina, Pâmela, Renata, Robson – que ao longo de todos esses anos nunca deixou de ser apoio dentro e fora do trabalho. Espero ter a mesma sorte e encontrar pessoas tão especiais nas próximas jornadas.

À Jaque, obrigada por estar sempre presente, me dando opções e caminhos, especialmente por ter me acolhido como parte da tua família. Obrigada Bruna por ser minha parceira científica, pela incondicional paciência e por sempre estar disposta a comemorar. Um agradecimento especial a Renata, que compartilhou todas as angústias e todas as alegrias desse processo. Obrigada por sempre acreditar! À Cibele, além de estar sempre disponível e disposta a ajudar, nossa parceria diária, especialmente durante a pandemia, garantiu que eu chegasse até aqui. Meu muitíssimo obrigada!

Às minhas grandes amigas Alícia e Belisa, muito obrigado por serem minhas companheiras em qualquer lugar do mundo, com vocês eu vou pra Marte!

Gostaria de agradecer também aos colegas do Programa de Déficit de Atenção/Hiperatividade - Adultos (ProDAH-A) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), que sob o comando do Eugenio, mantem um ambulatório e um grupo de pesquisa dedicado ao TDAH em adultos por mais de 20 anos. Meu agradecimento também aos pacientes e voluntários que generosamente contribuíram seu tempo, sua história e seu sangue para a concretização desse estudo.

E finalmente, aos meus incansáveis apoiadores Elvis e Liane, que nunca mediram esforços para que eu chegasse até aqui, mesmo sabendo que, a cada nova conquista, o caminho de volta para casa ficava cada vez mais distante.

O meu sincero muito obrigada a todos!

## Sumário

<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>7</b>
<b>Lista de Tabelas e Figuras</b> .....	<b>9</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>10</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>11</b>
<b>Capítulo 1: Introdução</b> .....	<b>12</b>
Apresentação .....	13
1.1 Transtornos do Neurodesenvolvimento .....	14
1.1.1 O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade.....	15
1.1.2 O Transtorno do Espectro Autista .....	19
1.2 Fatores etiológicos do TDAH e do TEA.....	22
1.2.1 Estudos de associação com genes candidatos.....	26
1.2.1.1 <i>ADGRL3/LPHN3</i> .....	29
1.2.3 Estudos de associação por varredura genômica - GWAS .....	32
1.2.3.1 Análises genômicas secundárias .....	34
1.2.4 Fatores genéticos compartilhados.....	37
1.2.5 Estudos de variantes raras e sequenciamento do exoma .....	39
<b>Capítulo 2: Justificativa e Objetivos</b> .....	<b>43</b>
2.1 Justificativa .....	44
2.2 Objetivos .....	45
2.2.1 Objetivos específicos .....	45
<b>Capítulo 3: <i>ADGRL3</i> rs6551665 as a Common Vulnerability Factor Underlying Attention-</b> <b>Deficit/Hyperactivity Disorder and Autism Spectrum Disorder</b> .....	<b>47</b>
Introduction .....	48
Methods .....	50
Results .....	51
Discussion.....	51
References.....	53

<b>Capítulo 4: Association of genetic risk for autism spectrum disorder with ADHD core symptom severity and long-term persistence</b> .....	<b>56</b>
Introduction .....	58
Methods .....	60
Results .....	61
Discussion.....	62
Tables and Figures .....	65
References.....	69
Supplementary Material .....	74
<b>Capítulo 5: Rare variants suggest genes potentially affecting ADHD symptoms in a clinical setting and the general population</b> .....	<b>77</b>
Introduction .....	80
Methods .....	82
Results .....	85
Discussion.....	87
Tables and Figures .....	93
References.....	96
Supplementary Material .....	103
<b>Capítulo 6: Discussão e Considerações finais</b> .....	<b>111</b>
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>122</b>
<b>Apêndice</b> .....	<b>138</b>
Meta-analysis and systematic review of <i>ADGRL3</i> ( <i>LPHN3</i> ) polymorphisms in ADHD susceptibility .....	139
<b>Produção Científica Adicional</b> .....	<b>149</b>
<b>Anexos</b> .....	<b>157</b>

## Lista de Abreviaturas

<i>ADGRL3</i>	Gene <i>Adhesion G protein-coupled receptor 3</i>
<i>BAIAP2</i>	Gene <i>BAR/IMD Domain Containing Adaptor Protein 2</i>
<i>COMT</i>	Gene <i>Catechol-O-methyltransferase</i>
<i>CNTNAP2</i>	Gene <i>Contactin Associated Protein 2</i>
<i>DBH</i>	Gene <i>Dopamine beta-hydroxylase</i>
<i>DRD2</i>	Gene <i>Dopamine receptor D2</i>
<i>DRD3</i>	Gene <i>Catechol-O-methyltransferase</i>
<i>DRD4</i>	Gene <i>Dopamine receptor D4</i>
<i>DRD5</i>	Gene <i>Dopamine receptor D5</i>
DSM-5	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5ª Ed
<i>DUSP6</i>	Gene <i>Dual specificity phosphatase 6</i>
<i>EN2</i>	Gene <i>Engrailed Homeobox 2</i>
<i>FLRT3</i>	<i>Fibronectine leucine rich transmembrane protein 3</i>
<i>FOXP2</i>	Gene <i>Forkhead box P2</i>
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GWAS	Estudo de associação por varredura genômica
<i>HTR1B</i>	Gene <i>5-hydroxytryptamine receptor 1B</i>
IMpACT	<i>International Multicenter Persistent ADHD Collaboration</i>
<i>KCNN2</i>	Gene <i>Potassium Calcium-Activated Channel Subfamily N Member 2</i>
<i>KMT2E</i>	Gene <i>Lysine Methyltransferase 2E</i>
<i>MACROD2</i>	Gene <i>Mono-ADP Ribosylhydrolase</i>
<i>MAOA</i>	Gene <i>Monoamine oxidase A</i>
<i>MEF2C</i>	Gene <i>Myocyte enhancer factor 2C</i>
<i>MTHFR</i>	Gene <i>Methylenetetrahydrofolate Reductase</i>
<i>OXTR</i>	Gene <i>Oxytocin receptor</i>
PGC	<i>Psychiatric Genomics Consortium</i>
PRS	Escore de risco poligênico
<i>PTBP2</i>	Gene <i>Polypyrimidine Tract Binding Protein 2</i>

<i>RELN</i>	Gene <i>Reelin</i>
CNV	Variação no número de cópias
<i>SHANK3</i>	Gene <i>SH3 And Multiple Ankyrin Repeat Domains 3</i>
<i>SLC25A12</i>	Gene <i>Solute Carrier Family 25 Member 12</i>
<i>SLC6A3/DAT1</i>	Gene <i>Solute carrier family 6 member 3/Dopamine transporter 1</i>
<i>SLC6A4/5-HTT</i>	Gene <i>Solute carrier family 6 member 4/5-hydroxytryptamine transporter</i>
<i>SNAP25</i>	Gene <i>Sinaptosome associated protein 25</i>
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade
TEA	Transtorno do Espectro Autista



## Lista de Tabelas e Figuras

Figura 1 Classificação dos Transtornos do Neurodesenvolvimento de acordo com o DSM-5	14
Tabela 1 Sintomas do TDAH de acordo com o DSM-5	17
Tabela 2 Sintomas do TEA de acordo com o DSM-5	20
Figura 2 O modelo do limiar para Transtornos do Neurodesenvolvimento	23
Figura 3 Relação entre a frequência alélica e o tamanho do efeito esperado para variantes na susceptibilidade aos Transtornos do Neurodesenvolvimento.	25
Figura 4 Cálculo dos escores de risco poligênico	366
Figura 5 Correlações genéticas e agrupamento entre oito transtornos psiquiátricos	388

## Resumo

O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) e o Transtorno do Espectro Autista (TEA) são duas condições neuropsiquiátricas muito prevalentes que causam prejuízo significativo na qualidade de vida dos indivíduos afetados ao longo de toda a sua vida. Fatores genéticos tem um papel central na etiologia de ambos os transtornos, sendo que o entendimento de possíveis mecanismos moleculares associados à arquitetura genética do TDAH e do TEA foi o principal objetivo desta Tese. Esta Tese reúne nossa contribuição avaliando o impacto desses fatores no desenvolvimento e no curso dos Transtornos do Neurodesenvolvimento, através de múltiplas estratégias complementares em genética molecular e estatística, incluindo técnicas clássicas e da era genômica. Por meio dessa abordagem, identificamos que um clássico gene candidato para o TDAH (*ADGRL3*) está associado com um perfil neurodesenvolvimento do transtorno, além de estar também associado à susceptibilidade ao TEA. Além disso, observamos que escores de risco poligênico derivados do TEA estão associados com sintomas de TDAH e com a trajetória clínica do transtorno ao longo da vida dos indivíduos. Por fim, nossas análises baseadas em exoma identificaram cinco genes (*PCYT1A*, *CRELD1*, *EXOSC6*, *DTX2*, *HDGF*) associados ao perfil clínico de TDAH, especificamente com sintomas de desatenção. Esses genes estão envolvidos em processos biológicos previamente relacionados com outros Transtornos do Neurodesenvolvimento. Em conclusão, o conjunto de evidências reunido nesta Tese, implicam fatores genéticos que afetam o desenvolvimento e variabilidade clínica dos Transtornos do Neurodesenvolvimento, além de sugerir a existência de fatores genéticos compartilhados entre o TDAH e o TEA. Os resultados apresentados reforçam a perspectiva de que a análise de diferentes fontes de variabilidade genética, além de um enfoque em um detalhamento fenotípico mais completo podem ser estratégias promissoras para expandir nossa compreensão acerca da etiologia desses transtornos.

## Abstract

Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) and Autism Spectrum Disorder (ASD) are two prevalent neuropsychiatric conditions that cause significant impairment in the quality of life of affected individuals throughout their lives. Genetic factors play a central role in the etiology of both disorders, and the understanding of molecular mechanisms possibly associated with the genetic architecture of ADHD and ASD was the main objective of this Thesis. This Thesis encompasses our contribution evaluating the impact of these factors on the development and course of Neurodevelopmental Disorders, by using multiple complementary strategies in molecular and statistical genetics, including classical and genomic techniques. Through this approach, we identified that a classic candidate gene for ADHD (*ADGRL3*) is associated with a neurodevelopmental profile of the disorder, as well as also being associated with susceptibility to ASD. In addition, we observed that polygenic risk scores derived from ASD are associated with symptoms of ADHD and with the clinical trajectory of the disorder throughout the lifespan. Finally, our exome-based analyzes identified five genes (*PCYT1A*, *CRELD1*, *EXOSC6*, *DTX2*, *HDGF*) associated with the clinical profile of ADHD, specifically with symptoms of inattention. These genes are involved in biological processes previously related to other Neurodevelopmental Disorders. In conclusion, the body of evidence gathered in this Thesis implicates specific genetic factors that affect the development and clinical variability of Neurodevelopmental Disorders, in addition to suggesting the existence of shared genetic liability between ADHD and ASD. The results presented reinforce the perspective that analyzing different sources of genetic variability, and focusing on detailed phenotypic information can be promising strategies to expand our understanding of the etiology of these disorders.

# Capítulo 1: Introdução



**“...let me be a part of the narrative  
In the story they will write someday  
Let this moment be the first chapter...”**

Lin-Manuel Miranda  
In: Hamilton – That would be enough

## Apresentação

Esta Tese compreende um conjunto de evidências e esforços no sentido de elucidar a arquitetura genética, os mecanismos biológicos subjacentes, e possíveis elos entre fatores de risco genéticos e o fenótipo clínico de dois transtornos psiquiátricos do neurodesenvolvimento, o Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) e o Transtorno do Espectro Autista (TEA). A primeira parte desta Tese traz uma introdução sobre aspectos clínicos, epidemiológicos e fatores de risco genéticos para o TDAH e TEA. Posteriormente, são apresentados os objetivos gerais e específicos desta Tese. Os capítulos seguintes, apresentados em forma de manuscritos originais, descrevem diferentes abordagens de genética molecular empregadas na busca de fatores genéticos específicos associados e suas implicações neurobiológicas no TDAH e no TEA. Por fim, a última sessão explora as evidências apresentadas e contextualiza o seu significado à luz do estado da arte da genética psiquiátrica.

## 1.1 Transtornos do Neurodesenvolvimento

Os Transtornos do Neurodesenvolvimento englobam diferentes transtornos psiquiátricos, que conforme caracterizados pelo Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – 5ª edição (DSM-5, do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*), são comumente diagnosticadas na infância e causam prejuízos no funcionamento pessoal, social, acadêmico ou profissional (Figura 1).

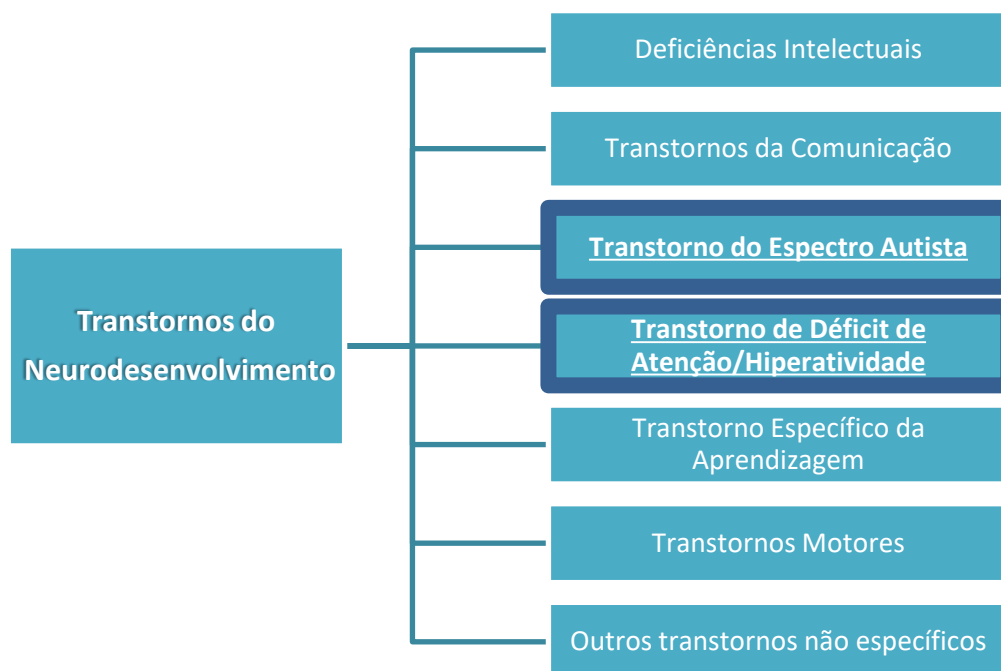


Figura 1: Classificação dos Transtornos do Neurodesenvolvimento de acordo com o DSM-5.

É aceito que esses transtornos representam um fenótipo extremo de um contínuo de sintomas e traços fenotípicos relacionados encontrados na população em geral. Entre os Transtornos do Neurodesenvolvimento mais comuns estão o TDAH e o TEA. Esses transtornos podem apresentar vários sintomas e outros traços fenotípicos em comum, sendo frequente a observação de comorbidade entre eles, o que sugere a

presença de fatores etiológicos compartilhados entre os transtornos. As próximas sessões trazem os aspectos clínicos, epidemiológicos e etiológicos dos dois transtornos em detalhe, seguidos de uma descrição acerca de fatores etiológicos específicos e compartilhados entre o TDAH e o TEA.

### **1.1.1 O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade**

O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) é um transtorno psiquiátrico comum, com uma prevalência mundial estimada em 5,3% em crianças e adolescentes (Polanczyk et al. 2007; 2015) e cerca de 2,8% em adultos (Fayyad et al. 2017). Ele é caracterizado por um padrão de sintomas prejudiciais de desatenção, agitação psicomotora e impulsividade impróprios ao nível de desenvolvimento e que acarretam em prejuízos no desempenho dos afetados em diferentes contextos (Faraone et al. 2015). É aceito que a primeira referência ao TDAH na literatura médica tenha ocorrido no final do século 18 (Schmitt 1970; Barkley and Peters 2012) com a descrição de problemas de hiperatividade ou desatenção semelhantes ao TDAH em crianças. Já em 1902 foi publicado, na renomada revista científica Lancet, um artigo descrevendo a observação da persistência desses sintomas também em adultos (Still 1902). Nosso grupo recentemente sugeriu que indivíduos com sinais e sintomas similares ao TDAH foram notados por estudiosos médicos ainda na Grécia antiga (Victor et al. 2018). Apesar do constante debate acerca da validade do diagnóstico, relatos tão antigos de apresentação clínica similar ao que hoje é conhecido como TDAH reforçam a noção de que o transtorno não é um fenômeno recente decorrente dos padrões de trabalho e ensino da sociedade ocidental moderna (Moncrieff and Timimi 2010; Bowden 2014). Além disso, a prevalência

similar do TDAH, mesmo quando medida em diversos países com características socioeconômicas e culturais distintas corrobora com o atual entendimento do TDAH como um transtorno de neurodesenvolvimento comum na população (Polanczyk et al. 2007; 2015).

Assim como as outras condições dentro da categoria de Transtornos do Neurodesenvolvimento, o início dos sintomas comumente ocorre ainda na infância, podendo ocorrer até os doze anos de idade (APA 2013). O diagnóstico do TDAH é clínico e envolve entrevista com o paciente e seus familiares, combinado a avaliação da presença dos sintomas característicos. O DSM é amplamente utilizado como critério de diagnóstico na maioria das pesquisas científicas realizadas em TDAH e também será o sistema utilizado nesta Tese (APA 2013). O DSM-5 preconiza que ao se definir um diagnóstico de TDAH devem estar presentes ao menos seis sintomas (para crianças e adolescentes) ou cinco sintomas (para adultos) em pelo menos um dos domínios (desatenção ou hiperatividade/impulsividade) (Tabela 1). Embora o TDAH seja frequentemente diagnosticado ainda na infância ou na adolescência, o transtorno costuma persistir na vida adulta, resultando em efeitos em longo prazo e impacto significativo nas atividades diárias dos indivíduos afetados e estão relacionados a várias adversidades funcionamento social, acadêmico e profissional (Shaw et al. 2012).

Apesar de o TDAH ser classicamente definido pela tríade sintomatológica de desatenção, hiperatividade e impulsividade, há uma acentuada heterogeneidade na apresentação clínica relacionada à idade, gênero, magnitude de sintomas, perfil de comorbidades e resposta ao tratamento (Faraone et al. 2015). Essas diversas



apresentações dos sintomas e os níveis de gravidade dos mesmos podem ainda mudar ao longo do tempo (Faraone et al. 2015; Franke et al. 2018), de forma que alguns indivíduos apresentam um declínio constante de sintomas da infância à idade adulta, principalmente nos sintomas de hiperatividade e impulsividade, ao passo que os sintomas de desatenção, tendem a seguir uma trajetória mais estável (Pingault et al. 2015). É estimado que aproximadamente 55-75% dos pacientes tem uma progressão crônica e persistente do transtorno ao longo de suas vidas (Faraone et al. 2006; Biederman et al. 2006; Luo et al. 2019).

**Tabela 1: Sintomas do Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade de acordo com o DSM-5.**

Desatenção	Hiperatividade/Impulsividade
1. Dificuldade em organizar tarefas e atividades;	1. É inquieto com as mãos e os pés quando sentado;
2. Dificuldade em seguir instruções e finalizar tarefas;	2. Parece estar sempre com o “motor ligado”;
3. Dificuldade em manter a atenção durante atividades ou brincadeiras;	3. Corre pelo ambiente e “escala” tudo, em momentos inapropriados;
4. Evita se engajar em tarefas que exijam esforço mental sustentado;	4. Dificuldade em brincar ou se engajar em atividades de lazer quieto;
5. Perda frequente de coisas necessárias à realização de tarefas;	5. Dificuldade em ficar sentado, em sala de aula e outras situações;
6. Parece não estar ouvindo;	6. Fala excessivamente;
7. Fácil distração por estímulos externos;	7. Dá respostas impulsivas, sem esperar o final da pergunta;
8. Esquecimento em atividades diárias;	8. Dificuldade em esperar pela sua vez;
9. Não dá atenção aos detalhes.	9. Interrompe os outros facilmente.

Além disso, a heterogeneidade do TDAH é marcada pelo grande número de comorbidades, aproximadamente 60% das crianças e 80% dos adultos com TDAH apresentam um ou mais transtornos psiquiátricos concomitantes (Reale et al. 2017;

Gnanavel et al. 2019). As comorbidades mais frequentes observadas no TDAH são transtornos por uso de substâncias, transtornos de ansiedade e humor, transtorno de oposição e desafio, e de conduta além do TEA (Chen et al. 2018).

Outro fator interessante diz respeito aos efeitos de prevalência diferencial de gênero do TDAH. Enquanto em amostras clínicas de crianças a proporção entre o gênero masculino e feminino é de aproximadamente 4:1, em amostras de adultos essa proporção é próxima de 1:1 (APA 2013). Ainda, o perfil de transtornos psiquiátricos presentes em comorbidade ao TDAH em crianças e adultos é distinto, sendo classicamente externalizante nas crianças com marcada prevalência do transtorno de oposição e desafio e do transtorno de conduta (Gnanavel et al. 2019), com aumento gradual de um perfil de internalização nos adultos com incidência de transtornos de ansiedade, humor e uso de substâncias (Kessler et al. 2011; Larsson et al. 2012; Faraone et al. 2015; Anker et al. 2018).

Quanto aos aspectos neurofisiológicos, os estudos realizados até o momento apontam, de maneira geral, para a existência de alterações estruturais e funcionais em regiões cerebrais de pacientes com TDAH. Brevemente, um grande estudo no campo da neuroimagem revelou que, em média, indivíduos com TDAH têm um menor volume intracraniano total e menores volumes de regiões subcorticais, como o núcleo *accumbens*, amígdala, núcleo caudado, putâmen, pálido, tálamo e hipocampo (Hoogman et al. 2017). Posteriormente, em uma avaliação das áreas corticais foi demonstrado que a área de superfície total, e em especial nas regiões frontal, cingulada e temporal são menores quando comparando crianças com TDAH aos controles (Hoogman et al. 2019).

Além disso, a estrutura da substância branca também foi encontrada alterada no TDAH, sugerindo uma potencial desorganização da conectividade do cérebro, principalmente nas conexões fronto-estriatal-cerebelares (van Ewijk et al. 2012).

Já no campo da neuroquímica do cérebro, uma extensa literatura sugere que as vias dopaminérgicas e noradrenérgicas são os sistemas de neurotransmissão mais afetados em pessoas com TDAH (Faraone et al. 2015). A dopamina desempenha um papel importante na atenção, planejamento e iniciação de respostas motoras, reação à novidade, motivação, aprendizagem e processamento de recompensa. Já a noradrenalina está envolvida com processos de atenção, alerta, vigilância, modulação da excitação e funções executivas, como inibição, memória de trabalho, adaptação flexível e comportamento direcionado a um objetivo (Faraone et al. 2015).

### **1.1.2 O Transtorno do Espectro Autista**

A primeira descrição formal de um transtorno de neurodesenvolvimento similar ao que agora é conhecido como Transtorno do Espectro Autista (TEA) remonta de 1943 por Leo Kanner (Kanner 1943; Harris 2018), seguida em 1944 por um artigo de Hans Asperger relatando sintomas do que foi chamado de “psicopatia autista” (Asperger 1944). Atualmente, o TEA é definido como um transtorno de neurodesenvolvimento com influência marcante e persistente ao longo de toda a vida do indivíduo. Ele é caracterizado por prejuízos na interação e comunicação social, presença de padrões repetitivos e restritivos de comportamentos, interesses ou atividades (APA 2013). Estimativas epidemiológicas recentes sugerem a ocorrência do transtorno em todos os grupos étnicos e socioeconômicos (Baio et al. 2018) com uma prevalência variando entre

1-2% da população (Elsabbagh et al. 2012; Lyall et al. 2017; Baio et al. 2018), relatando também uma maior incidência de TEA em meninos do que em meninas, com proporções médias de 4:1.

Assim como no caso do TDAH, o diagnóstico do TEA continua sendo essencialmente clínico, sendo realizado com base na sintomatologia do indivíduo. Ele é tipicamente diagnosticado ainda na primeira infância sendo que os protocolos diagnósticos mais observados no campo da pesquisa clínica, e os quais serão utilizados no decorrer desta Tese, seguem as recomendações do DSM. Especificamente, o diagnóstico requer que os indivíduos preencham critérios em pelos menos cinco itens: um sintoma em cada um dos três itens demonstrando problemas relacionados à interação social, além da presença de outros dois sintomas referentes a comportamentos e interesses restritos (Tabela 2) (APA 2013).

**Tabela 2: Sintomas do Transtorno do Espectro Autista de acordo com o DSM-5.**

<b>Comunicação e socialização</b>	<b>Padrões de comportamento restrito, estereotipado e repetitivo</b>
1. Déficits socioemocionais (dificuldade para estabelecer uma conversa normal; dificuldade para responder interações sociais; compartilhamento reduzido de interesses emoções ou afeto);	1. Movimentos, uso de objetos ou falas estereotipadas ou repetitivas;
2. Déficits na comunicação não verbal (contato visual e linguagem corporal);	2. Insistência em rotina inflexível ou padrões ritualizados de comportamentos verbais ou não verbais;
3. Déficits para desenvolver, manter e compreender relacionamentos (ausência de interesse por pares);	3. Interesses fixos e altamente restritos que são anormais em intensidade ou foco;
	4. Hipo ou hiperatividade a estímulos sensoriais ou interesses incomuns por aspectos sensoriais do ambiente;

Apesar dos traços e sintomas característicos utilizados como tríade diagnóstica, há notável heterogeneidade na apresentação clínica do TEA com grande variedade de sintomas nas áreas cognitiva, emocional e neurocomportamental (Rapin and Tuchman 2008). Os indivíduos acometidos variam quanto à gravidade, ao tipo e à frequência de sintomas apresentados e com relação a outros transtornos neuropsiquiátricos comórbidos (Levy et al. 2009). Estes últimos incluem déficits cognitivos e intelectuais, depressão, ansiedade, agressividade auto e hetero dirigida, problemas gastrointestinais, perturbações do sono, além de sintomas clássicos de TDAH como desatenção, hiperatividade e agitação psicomotora, além da impulsividade (Newschaffer et al. 2007; Levy et al. 2009). De fato, o TDAH é a comorbidade mais comum em indivíduos com TEA, afetando aproximadamente um terço destes (Lai et al. 2019).

Ao longo da vida, pode haver uma mudança quanto à intensidade dos sintomas clássicos do TEA, que pode ser abrandada, porém ainda presente durante a adolescência ou idade adulta (McGovern and Sigman 2005). Ainda, é comum que o perfil de comorbidades também se altere, com uma maior presença de ansiedade e depressão durante e após a adolescência (Gotham et al. 2015), além de uma modificação no padrão de irritabilidade e comportamentos agressivos (Hill et al. 2014).

Aspectos neurobiológicos do TEA sugerem que o transtorno é resultante da reorganização geral do cérebro começando no início do desenvolvimento (Lord et al. 2018), envolvendo diversas características cerebrais anatômicas e envolvimento de vários neurotransmissores e neuropeptídeos. Muitas vias neuroquímicas diferentes já foram implicadas na neurofisiologia do TEA incluindo aquelas relacionadas a GABA e glutamato,

serotonina, dopamina, oxitocina, melatonina, vitamina D, acetilcolina entre outros, no entanto, até o momento, existem poucos achados neuroquímicos replicados (para revisão ver Marotta et al. 2020). Por outro lado, uma grande meta-análise recente identificou que estruturas subcorticais como o putâmen, a amígdala e o núcleo *accumbens* têm volumes menores em indivíduos com TEA, quando comparados a controles (Van Rooij et al. 2018). O mesmo estudo sugeriu ainda que os casos com TEA têm uma maior espessura cortical em áreas cerebrais frontais e menor espessura cortical em áreas cerebrais temporais/occipitais.

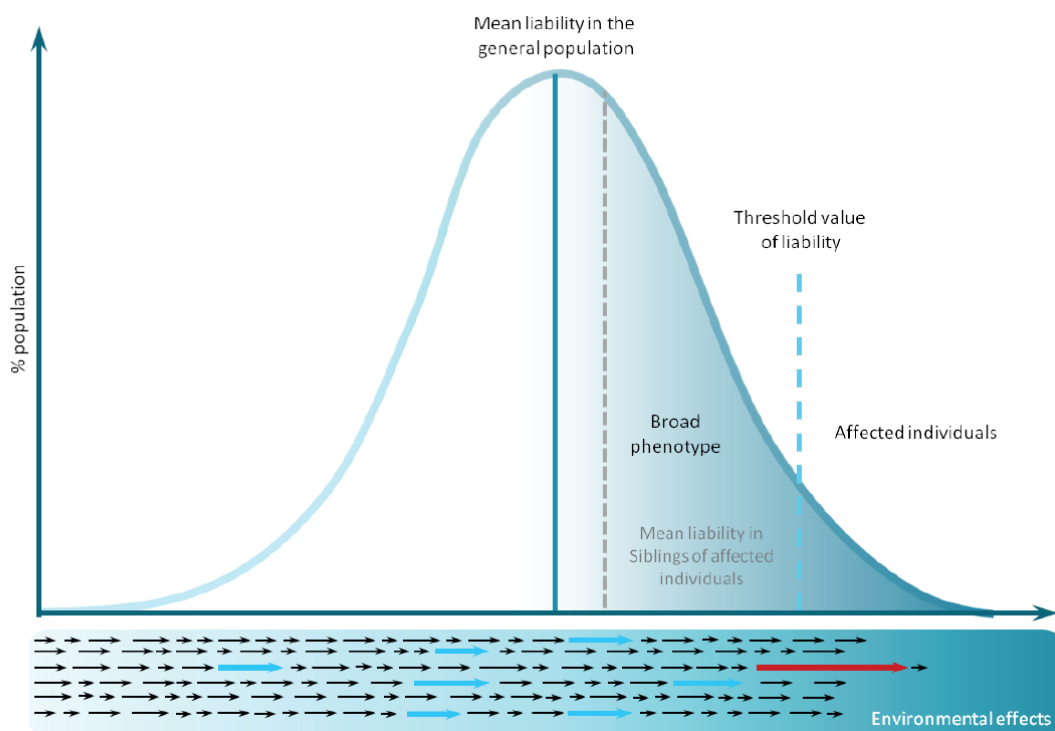
## 1.2 Fatores etiológicos do TDAH e do TEA

De maneira geral os transtornos psiquiátricos, inclusos o TDAH e o TEA, têm uma etiologia multifatorial, decorrendo da confluência de distintos fatores de risco genéticos, epigenéticos, ambientais e as múltiplas interações entre estes fatores, todos exercendo pequeno efeito no que diz respeito à susceptibilidade à doença (Ronald et al. 2006; Robinson et al. 2016; Thapar et al. 2017; Franke et al. 2018; Faraone and Larsson 2019)(Figura 2).

No que tange os efeitos genéticos na etiologia, são marcadas as características de poligenicidade e aditividade (vários genes com múltiplas variantes genéticas de pequeno efeito espalhados pelo genoma) (Robinson et al. 2016; Thapar et al. 2017; Franke et al. 2018; Faraone and Larsson 2019).

A influência genética na susceptibilidade ao TDAH tem sido explorada nos últimos 50 anos a partir das observações clínicas de agregação familiar (Morrison and

Stewart 1971; Cantwell 1972). Nesse sentido, o risco de desenvolver o transtorno em familiares de primeiro grau de pacientes com TDAH é de 5 a 10 vezes maior quando comparados a controles (Biederman et al. 1990; 1995). Os estudos com gêmeos apontam que o componente genético da susceptibilidade ao TDAH é alto, com uma herdabilidade estimada em 70 - 80% tanto em crianças quanto em adultos (Chang et al. 2013; Larsson et al. 2013; Larsson et al. 2014; Brikell et al. 2015).



**Figura 2: O modelo do limiar para Transtornos do Neurodesenvolvimento.** O modelo do limiar, assumindo uma distribuição normal contínua dos traços fenotípicos na população geral, postula que a susceptibilidade aos transtornos pode ser determinada quantitativamente pelos efeitos combinados da predisposição genética e dos fatores ambientais. Efeitos fracos de variantes genéticas comuns (setas pretas), efeitos intermediários e potencialmente maiores de variação rara em alguns indivíduos (setas azuis e vermelhas, respectivamente) e quaisquer efeitos ambientais (barra inferior) afetam conjuntamente o risco. A figura foi adaptada de (Chaste et al. 2017).

No caso do TEA, uma ampla gama de estudos também procurou abordar os aspectos genéticos na etiologia do transtorno, sendo que uma meta-análise de sete estudos com gêmeos identificou uma alta herdabilidade também no TEA, com estimativas

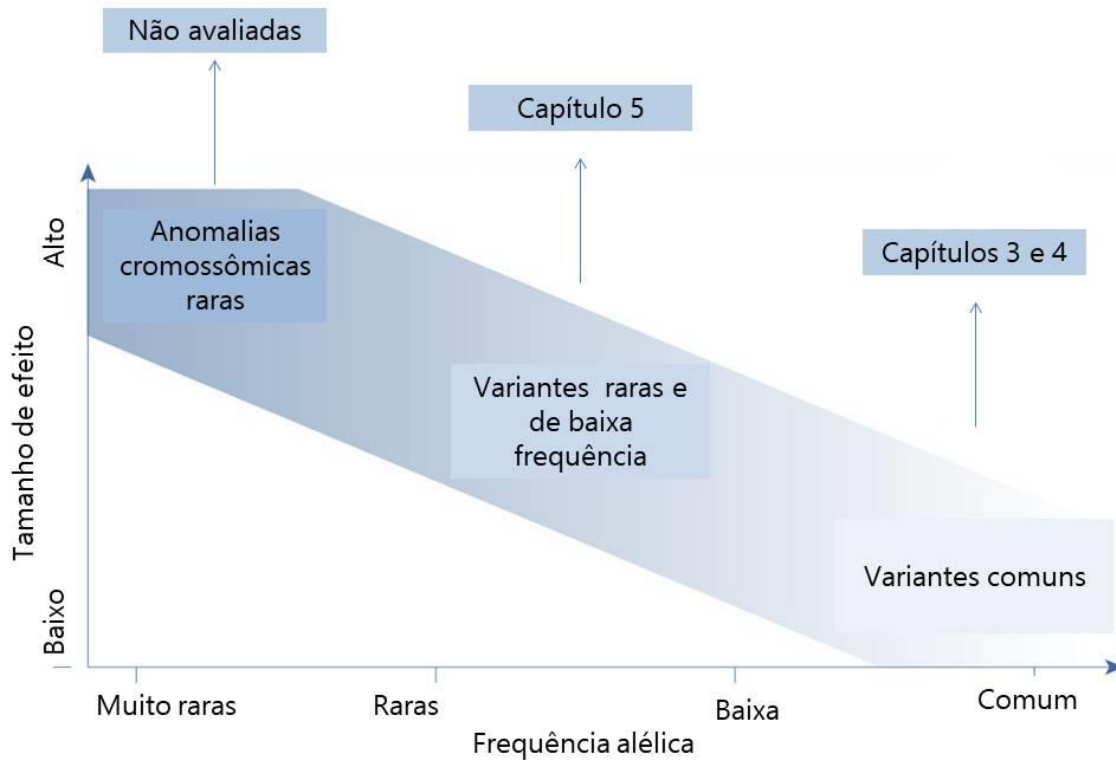
entre 74-93% (Tick et al. 2016). Ainda, o risco de recorrência do transtorno é cerca de 20 vezes maior em irmãos de crianças afetadas em comparação com a população geral (Levy et al. 2009).

Outro fator interessante relacionado à marcante influência genética na etiologia do TEA é ocorrência de traços e características do fenótipo autista em algumas síndromes monogênicas ou cromossômicas. Por exemplo, o diagnóstico de síndrome do X-frágil ocorre em 3–5% dos pacientes com TEA (Fernandez and Scherer 2017). Além desta, outras síndromes conhecidas, transposições, deleções, inserções ou outros rearranjos cromossômicos são identificados em até 25% dos indivíduos com TEA (Fernandez and Scherer 2017).

Considerando-se as altas estimativas de herdabilidade dos transtornos, e o padrão de agregação familiar evidenciando uma influência genética marcante na sua etiologia, fica evidente o interesse pelo estudo dos fatores genéticos específicos associados com o seu desenvolvimento, resultando em muitos estudos realizados a fim de revelar genes potencialmente associados. Diferentes abordagens em estudos moleculares, tanto aquelas baseadas em hipóteses, como os estudos de gene-candidato, quanto livre de hipóteses, como varreduras genômicas de ligação e de associação têm sido empregados na busca de genes e variantes genéticas potencialmente envolvidas no desenvolvimento do TDAH e do TEA (Figura 3). Ainda que a herdabilidade desses transtornos seja considerada alta, fatores como o caráter poligênico e a heterogeneidade característica têm tornado a identificação de variantes genéticas individuais associadas em uma desafiadora e nem sempre prolífera tarefa. As próximas seções destacam os



principais resultados das diferentes abordagens e o estado-da-arte da literatura acerca dos fatores genéticos associados aos transtornos de neurodesenvolvimento.



**Figura 3: Relação entre a frequência alélica e o tamanho do efeito esperado para essas variantes na suscetibilidade aos Transtornos do Neurodesenvolvimento.** Variantes genéticas comuns explicam aproximadamente 40-50% da herdabilidade desses transtornos, mas em comparação com variantes mais raras, as variantes comuns individuais têm efeitos muito menores sobre o risco dos transtornos. Os capítulos 3 e 4 desta tese investigaram o papel das variantes comuns no TDAH e TEA. Além disso, no capítulo 5, foi examinada a contribuição de variantes raras e de baixa frequência no TDAH. Figura adaptada de Faraone et al., 2015.

Além dos fatores de risco genéticos, vale ressaltar que fatores de risco ambientais para ambos o TDAH e o TEA tem sido sugeridos e estudados como parte dos mecanismos etiológicos subjacentes a esses transtornos. O conjunto de evidências atual aponta que os principais fatores de riscos ambientais para os transtornos de

neurodesenvolvimento ocorrem durante períodos críticos de desenvolvimento, podendo alterar os principais mecanismos neurobiológicos envolvidos (Carlsson et al. 2020).

Nesse contexto, dentre os fatores de risco ambientais que têm sido associados consistentemente ao TDAH, ganham destaque fatores pré-natais e perinatais, como tabagismo e uso de álcool pela mãe durante a gravidez, baixo peso ao nascer, parto prematuro e exposição intrauterina a toxinas ambientais e metais pesados, como pesticidas organofosforados, zinco e chumbo (Banerjee et al. 2007; Scassellati et al. 2012).

Apesar da especulação acerca dos efeitos de vários potenciais fatores ambientais, diversas revisões e meta-análises sugerem que apenas alguns fatores de risco ambientais possam estar envolvidos na etiologia do autismo. Em específico, idade paternal avançada, trauma durante o nascimento (particularmente com presença de hipóxia), obesidade materna, um curto intervalo entre as gestações, diabetes mellitus gestacional e uso de valproato durante a gravidez foram associados ao aumento do risco de autismo (Modabbernia et al. 2017). Ainda é de fundamental importância no cenário atual mencionar que esses estudos relataram a ausência de evidências claras de que o autismo está associado com vacinação (Taylor et al. 2014).

### **1.2.1 Estudos de associação com genes candidatos**

Por muitos anos, os estudos de genes-candidato estavam na vanguarda dos esforços na tentativa de identificar variantes genéticas de risco para os transtornos

psiquiátricos. Esses estudos consistem na seleção de genes e variantes genéticas específicas levando em consideração hipóteses previamente elaboradas acerca da função gênica nos quais as frequências dessas variantes genéticas são comparadas entre indivíduos com o fenótipo de interesse e aqueles que não apresentam tal característica (Jorgensen et al. 2009).

Neste âmbito, considerando-se o conhecimento *a priori* sobre a neurofisiologia do TDAH, genes que codificam componentes dos sistemas de neurotransmissão, especialmente do sistema dopaminérgico, foram os mais estudados (Faraone and Mick 2010; Hawi et al. 2015). Apesar de centenas de outros genes terem sido estudados ao longo dos anos, os principais genes candidatos amplamente investigados, para os quais existe evidência de replicabilidade e associação em meta-análise, incluem apenas os genes dos receptores de dopamina D2, D4 e D5 (*DRD2*, *DRD4* e *DRD5*, respectivamente), do transportador de dopamina (*SLC6A3*, também conhecido como *DAT1*) e de serotonina (*SLC6A4*, também conhecido como *5-HTT*), do receptor 1B de serotonina (*HTR1B*), da proteína associada ao sinaptossoma de 25 kDa (*SNAP25*) e das enzimas dopamina-beta-hidroxilase (*DBH*), monoamino oxidase (*MAOA*) e catecol-O-metiltransferase (*COMT*), além da proteína associada ao inibidor 1 da angiogênese específica do cérebro 2 (*BAIAP2*) (Gizer et al. 2009; Stergiakouli and Thapar 2010; Franke et al. 2012; Bonvicini et al. 2016).

Similarmente, um grande número de estudos investigando os aspectos etiológicos do TEA usou também a abordagem de gene candidato. Seguindo a característica desse tipo de estudo, a maioria investigava um pequeno número de variantes genéticas em tamanhos de amostra relativamente pequenos. Uma ampla gama

de vias e mecanismos biológicos foi avaliada nesses estudos, incluindo componentes relacionados ao metabolismo de neurotransmissores (por exemplo, serotonina e glutamato), migração neural, adesão de células neuronais, bem como genes implicados em processos relacionados à fala e linguagem, cognição e interação social (Miles 2011). Uma grande meta-análise procurou investigar de forma abrangente os estudos de associação de variantes comuns em genes candidatos no TEA (Warrier et al. 2015). Essa revisão encontrou mais de 500 genes estudados, porém identificou apenas sete genes que apresentavam evidências significativas de sua associação com a susceptibilidade ao TEA, sendo eles *DRD3* (receptor de dopamina D3), *CNTNAP2* (proteína associada à contactina tipo 2), *RELN* (reelina), *OXTR* (receptor de oxitocina), *SLC25A12* (proteína de carreamento mitocondrial ligante de cálcio), *EN2* (*Engrailed Homeobox 2*) e *MTHFR* (metileno tetrahidrofolato redutase).

Embora alguns conjuntos de genes candidatos tenham sido propostos, os estudos deste tipo também foram criticados principalmente por sua baixa taxa de replicação. Apesar dos desafios, um maior entendimento a respeito dos fatores envolvidos na susceptibilidade genética a esses transtornos ainda é necessário. E nesse sentido, estudos com genes candidato cuidadosamente selecionados, bem delineados, em amostras homogêneas e bem caracterizadas, que também contam com replicações em amostras independentes podem nos ajudar a entender melhor o papel desses fatores genéticos na etiologia de dos Transtornos do Neurodesenvolvimento.

### 1.2.1.1 *ADGRL3 (LPHN3)*

Nesse contexto, alguns genes candidatos, como o *ADGRL3*, ainda merecem destaque e continuam recebendo atenção na literatura. O gene *ADGRL3* (do inglês, *Adhesion G protein-coupled receptor L3*, previamente conhecido como *LPHN3*), está localizado na região cromossômica 4q13.2 e codifica um receptor de adesão transmembrana acoplada à proteína G. A expressão do gene predomina no cérebro, ocorrendo preferencialmente em regiões como amígdala, cerebelo e córtex cerebral e principalmente, em neurônios glutamatérgicos (Arcos-Burgos et al. 2010). Esse receptor tem atuação híbrida com funções na adesão celular e também de sinalização intracelular (Martinez et al. 2011), de forma que, nas áreas cerebrais onde é expresso, desempenha um papel na regulação da liberação de neurotransmissores e desenvolvimento de sinapses (O'Sullivan et al. 2012; 2014).

O conjunto de evidências que apoia o papel do gene *ADGRL3* na susceptibilidade ao TDAH, e a outros transtornos psiquiátricos e do neurodesenvolvimento engloba estudos de ligação, de associação, modelos animais e diversos endofenótipos associados. Desde o primeiro achado, ainda em um estudo de ligação (Arcos-Burgos et al. 2004; 2010) até a presente Tese, esse conjunto de evidências tornou o gene *ADGRL3* como um dos mais promissores e bem caracterizados genes em relação à susceptibilidade ao TDAH.

Após os estudos de ligação realizados em um isolado populacional da Colômbia, a população Paisa, revelarem um haplótipo de risco no gene *ADGRL3* que foi significativamente associado ao TDAH (Arcos-Burgos et al. 2010), uma ampla gama de estudos de associação envolvendo diferentes variantes e haplótipos do gene têm

evidenciado sua influência nas bases genéticas do TDAH (Arcos-Burgos et al. 2010; Ribasés et al. 2011; Jain et al. 2012; Choudhry et al. 2012; Bruxel et al. 2015; Hwang et al. 2015; Martinez et al. 2016; Gomez-Sanchez et al. 2016; Acosta et al. 2016; McNeill et al. 2020). No entanto, apesar de abranger vários estudos, com replicações em amostras de diferentes grupos e etnias, a maioria destes foi realizada em amostras de crianças com TDAH. Recentemente, uma nova meta-análise (Apêndice) que reuniu oito estudos independentes, reafirmou o papel desse gene na susceptibilidade ao TDAH, demonstrando uma modesta, porém significativa associação de variantes desse gene com o TDAH especialmente no que tange ao grupo diagnosticado ainda na infância (Bruxel et al. 2020).

O polimorfismo mais estudado, rs6551665 (A/G), consiste em um SNP (polimorfismo de nucleotídeo único, do inglês *Single Nucleotide Polimorphism*) localizado no sexto íntron. O alelo G foi associado com a susceptibilidade ao TDAH em diversas amostras (Arcos-Burgos et al. 2010; Choudhry et al. 2012; Hwang et al. 2015) e também com a resposta terapêutica para o uso de estimulantes (Arcos-Burgos et al. 2010; Labbe et al. 2012; Bruxel et al. 2015).

O atual conjunto de evidências aponta o gene *ADGRL3* como importante moderador do desenvolvimento do sistema nervoso central, especialmente nos sistemas dopaminérgico e glutamatérgico. Estudos envolvendo diversos modelos animais mostraram que processos de *knockout* ou *knockdown* de ortólogos do gene resultam em fenótipos comportamentais com aumento da atividade locomotora, o que é comparável à hiperatividade observada em indivíduos com TDAH (Lange et al. 2012; Wallis et al. 2012; van der Voet et al. 2015; Reuter et al. 2016; Orsini et al. 2016). E esse padrão de

comportamento pode ser posteriormente normalizado com o uso de fármacos estimulantes comumente usados no tratamento do TDAH, como o metilfenidato e a atomoxetina (Lange et al. 2012).

Esses mesmos estudos observaram ainda que a manipulação gênica dos ortólogos do *ADGRL3* resulta em sinalização dopaminérgica anormal (van der Voet et al. 2015), neurônios dopaminérgicos desorganizados e em número reduzido (Lange et al. 2012), aumento dos níveis de dopamina no corpo estriado e níveis alterados de receptores e transportadores de dopamina e serotonina, além de mudanças na expressão de outros genes previamente relacionados ao metabolismo de neurotransmissores e de desenvolvimento neuronal (Wallis et al. 2012).

O mecanismo subjacente a esse papel crucial no neurodesenvolvimento pode estar relacionado com a função da ADGRL3 como um receptor híbrido, que auxilia na adesão celular e na transdução de sinal intracelularmente. A subunidade extracelular da ADGRL3 interage com a proteína FLRT3 (*Fibronectin leucine rich transmembrane protein 3*). Essas proteínas são expressas em vários tecidos, incluindo o cérebro, onde atuam na migração celular e na orientação dos axônios (Yamagishi et al. 2011). O complexo trans-sináptico formado pela interação FLRT3-ADGRL3 dispara eventos de transdução de sinal pré- e pós-sináptico, que ativa e modula a eficácia e plasticidade sináptica (O'Sullivan et al. 2012; 2014). Esta ligação é necessária para suportar o desenvolvimento de sinapses glutamatérgicas e, portanto, está implicada no desenvolvimento do sistema nervoso.

### 1.2.2 Estudos de associação por varredura genômica - GWAS

Recentemente, com o avanço e disponibilidade de técnicas de análise em larga-escala, os estudos de associação por varredura genômica (GWAS, do inglês *Genome-Wide Association Studies*) têm substituído os estudos com genes candidato como principal metodologia de análise na busca de genes relacionados a diferentes condições psiquiátricas. Esses estudos têm crescido exponencialmente devido ao desenvolvimento de consórcios internacionais, que no intuito de atingir os tamanhos amostrais necessários para a identificação de sinais de associação em nível genômico, passaram de alguns milhares de indivíduos para mais de um milhão em estudos recentes (Horwitz et al. 2018; Lee et al. 2018; Howard et al. 2018; Linnér et al. 2020).

Os resultados cada vez mais impressionantes derivados dos GWAS confirmaram que a arquitetura genética dos transtornos psiquiátricos é altamente complexa com marcada influência de um padrão poligênico e aditivo de variantes genéticas comuns de pequeno efeito (Demontis et al. 2019; Grove et al. 2019; Howard et al. 2018; Wray et al. 2014). Além disso, os GWAS têm se mostrado de grande importância pela possibilidade de apontar novos genes/*locus* candidatos associados aos transtornos psiquiátricos (Thapar et al. 2015). Contudo, nos casos específico do TDAH e do TEA, mesmo esforços colaborativos em larga escala, como o *Psychiatric Genomics Consortium* (PGC), ainda resultaram em um modesto sucesso em fornecer evidências para novas influências biológicas na fisiopatologia do TDAH e do TEA (Demontis et al. 2019; Grove et al. 2019).

O maior estudo de GWAS de TDAH até o momento, incluindo 20.183 casos e 35.191 controles, relatou suas primeiras descobertas em 2019, identificando 12 *loci*



independentes significativos (contendo 304 variantes genéticas) em todo o genoma associados com a susceptibilidade ao transtorno (Demontis et al. 2019). Ainda, a partir desses achados a herdabilidade molecular (baseada nos efeitos de todas as variantes genéticas comuns medidos no GWAS, conhecida como  $SNP-h^2$ ) foi estimada em 28% (Demontis et al. 2019).

Apesar de não confirmar nenhum dos genes candidatos previamente sugeridos para o TDAH, os loci identificados implicam vários genes previamente relacionados a fenótipos psiquiátricos ou com papéis biológicos relevantes, como em processos de neurodesenvolvimento. Entre eles destacam-se o *FOXP2* (*Forkhead box P2*), implicado na regulação dos níveis de dopamina e previamente associado com TDAH em adultos (Ribasés et al. 2012); *MEF2C* (*Myocyte enhancer factor 2C*), atuante da diferenciação de tecido neuronal e relacionados à deficiência intelectual (Rocha et al. 2016; Harrington et al. 2016); e o *DUSP6* (*Dual specificity phosphatase 6*), que também atua na modulação dos níveis de dopamina nas sinapses (Mortensen 2013).

Posteriormente, um segundo estudo em larga escala, capitaneado pelo consórcio internacional IMpACT (*International Multicenter Persistent ADHD Collaboration*), do qual o nosso grupo de pesquisa é membro, buscou avaliar se o TDAH na infância ou em adultos é associado a diferentes fatores genéticos (Rovira et al. 2020). O estudo sugeriu que existe uma alta genética compartilhada nas formas infantis e adultas da doença (correlação genética –  $r_G$  – de 81%), confirmando o aspecto de um transtorno do neurodesenvolvimento; porém também revelou que podem existir fatores dinâmicos, sugerindo que não há uma sobreposição completa entre o conjunto de variantes

genéticas associadas com a susceptibilidade ao TDAH e a arquitetura genética relacionada à persistência do transtorno ao longo da vida.

Quanto ao TEA, o mais recente GWAS de susceptibilidade à condição, também um trabalho do PGC, que contou com uma amostra de 18.381 indivíduos com o transtorno e 27.969 controles, identificou a associação de cinco loci independentes do genoma, contendo 93 SNPs significativos (Grove et al. 2019). Notavelmente, vários genes localizados nos loci identificados já haviam sido previamente relacionados à etiologia do TEA, especialmente em estudos de variantes raras (incluindo *PTBP2* - *Polypyrimidine Tract Binding Protein*, e *KMT2E* - *Lysine Methyltransferase 2E*). Outros genes identificados nesse trabalho foram: *MACROD2* (*Mono-ADP Ribosylhydrolase 2*) e *KCNN2* (*Potassium Calcium-Activated Channel Subfamily N Member 2*).

Ainda que o número de loci significativamente associados seja pequeno, as estimativas de herdabilidade molecular do TEA giram em torno 12%, evidenciando um considerável papel de variantes genéticas comuns na arquitetura genética desse transtorno (Grove et al. 2019).

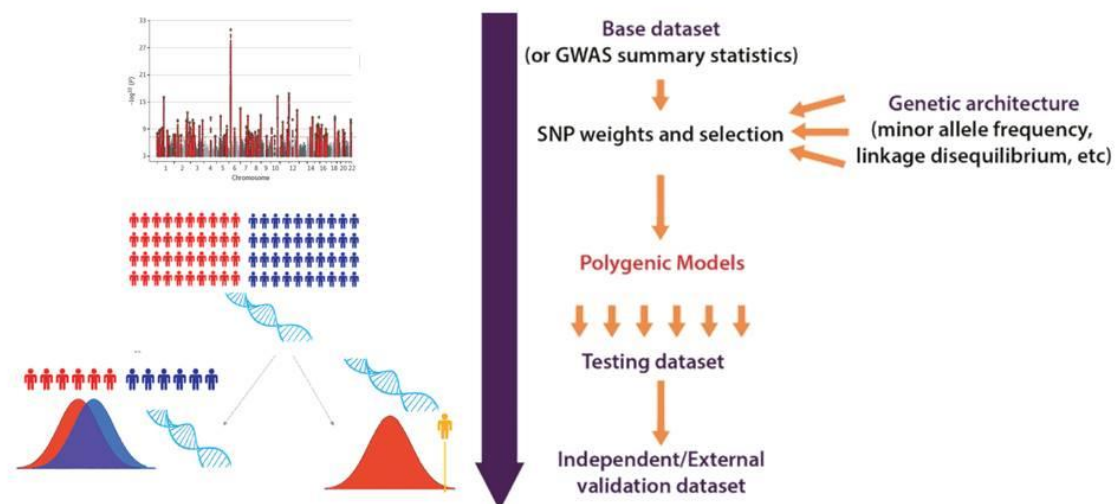
### **1.2.2.1 Análises genômicas secundárias**

A partir dos avanços e resultados iniciais cruciais obtidos com os GWAS, o relativo sucesso da técnica de varredura genômica tem propiciado que novos métodos estatísticos que estendem o potencial dos dados para além da descoberta de variantes associadas sejam criados. Dessa forma, apesar da realização das análises primárias de GWAS estarem atualmente limitadas aos grandes consórcios, é imprescindível a utilização

dos dados genômicos em estudos secundários, considerando análises mais específicas que podem ser de grande valia, especialmente na detecção de vias de sinalização e mecanismos biológicos envolvidos com a arquitetura genética dos diferentes transtornos psiquiátricos.

Nesse sentido, destacam-se métodos estatísticos derivados como, por exemplo, análises baseadas em genes, análises de vias/rotas biológicas e os escores de risco poligênico (PRS, do inglês *polygenic risk score*). Enquanto o GWAS visa detectar associações entre variantes genéticas e o desfecho analisado, o PRS é um método aditivo que observa o efeito combinado de vários SNPs de pequeno efeito e sua associação com o fenótipo (Wray et al. 2014; Ruderfer et al. 2014; Euesden et al. 2015). Para isso, são utilizados os dados de associação das variantes genéticas analisadas em um GWAS e levando em consideração o tamanho de efeito estimado para cada uma delas. Para realizar um estudo PRS, são necessárias duas amostras independentes, uma da qual o GWAS é derivado e outra na qual a previsão do PRS será feita. O PRS é construído como um somatório para cada indivíduo, a partir do número de cópias do alelo de risco de cada SNP no conjunto de dados de descoberta multiplicado pelo tamanho de efeito da sua associação (Choi et al. 2020) (Figura 4).

O PRS tem sido comumente utilizado como uma medida da predisposição genética de um indivíduo a um determinado fenótipo (Wray et al. 2014); ainda assim, a variância explicada pelo PRS (também conhecido como  $R^2$ ) é geralmente baixa. No caso do TDAH e do TEA a quantidade de variação explicada pelo escore poligênico nos seus estudos originais foi de 5,5% e 2,45%, respectivamente (Demontis et al. 2019; Grove et al. 2019).



**Figura 4 Cálculo dos escores de risco poligênico.** Os escores de risco poligênico podem ser calculados a partir dos dados genômicos de um indivíduo para fenótipos de interesse, os quais apresentam variantes de risco identificadas previamente. São essencialmente uma contagem do número de variantes de risco presentes no DNA do indivíduo, ponderadas de acordo com o tamanho de efeito observado para essas variantes. Adaptado de Wray et al. 2014 e Babb de Villiers et al. 2020.

A validade do método de PRS foi demonstrada inúmeras vezes. Ainda antes da publicação do maior GWAS de TDAH realizado até o momento, um estudo havia demonstrado que PRS para TDAH criado a partir de amostras clínicas (ou seja, caso-controle) estava significativamente associado com traços fenotípicos de desatenção e hiperatividade na população em geral (Martin et al. 2014). Além disso, a análise reversa também se aplica; já foi sugerido que o PRS associado à variação nos traços de TDAH em crianças da população em geral estaria associado ao estado de caso-controle de TDAH, além do perfil de gravidade dos sintomas de TDAH em uma amostra clínica de crianças (Stergiakouli et al. 2015).

Similarmente, estudos de PRS derivados de GWAS do autismo foram associados com traços de comunicação social na população (Robinson et al. 2016; Pourcain et al.

2018), traços de autismo (Taylor et al. 2019), e também susceptibilidade ao transtorno (Underwood et al. 2019).

### **1.2.3 Fatores genéticos compartilhados**

Como mencionado anteriormente os Transtornos do Neurodesenvolvimento apresentam sobreposição de sintomas e características fenotípicas. Similaridades entre traços cognitivos e comportamentais, além das características centrais de ambos TDAH e TEA, em particular a desatenção e problemas de comportamento/socialização, são comumente observados (Rommelse et al. 2011; van der Meer et al. 2017).

Pesquisas nos últimos anos mostraram que o TDAH é a comorbidade mais comum em crianças com TEA (Lai et al. 2019), enquanto que entre as crianças com TDAH 12% atendem aos critérios para um diagnóstico de TEA (Jensen and Steinhausen 2015). Ainda, um estudo com gêmeos indicou que crianças com diagnóstico de um dos dois transtornos costumam apresentar características fenotípicas do outro, mesmo que não preencham o diagnóstico completo de comorbidade (Ghirardi et al. 2018).

Evidências crescentes sugerem que esse alto grau de correlações fenotípicas entre o TDAH e o TEA podem estar de fato refletindo fatores genéticos compartilhados, os quais por sua vez poderiam explicar, ao menos em parte, o alto nível de comorbidade encontrado entre os transtornos.

Utilizando resultados de diferentes estudos de GWAS é possível computar correlações genéticas, indicando em que grau a arquitetura poligênica desses transtornos se sobrepõe (Bulik-Sullivan et al. 2015; Brainstorm Consortium et al. 2018). A correlação

genética sugere fatores de risco compartilhados e uma possível fisiopatologia em comum, e pode estar associada à pleiotropia biológica (que ocorre quando um gene tem efeitos sobre vários fenótipos), ou à pleiotropia mediada (que ocorre quando um gene afeta um fenótipo que, por sua vez, afeta outro). Os dados genômicos corroboram a associação observada clinicamente entre os transtornos, o maior de GWAS de autismo publicado até o momento identificou uma correlação genética significativa e proeminente com o TDAH ( $r_G = 0.36$ ) (Grove et al. 2019; Lee et al. 2019).

No mesmo contexto, outro estudo em grande escala que investigou as relações genômicas entre oito transtornos psiquiátricos, incluindo entre eles o TDAH e o TEA, identificou três grupos de transtornos inter-relacionados: um compreendendo transtornos caracterizados por comportamentos, um segundo compreendendo transtornos psicóticos e de humor, e um terceiro compreendendo os Transtornos do Neurodesenvolvimento de início precoce (TEA e TDAH) (Lee et al. 2019).

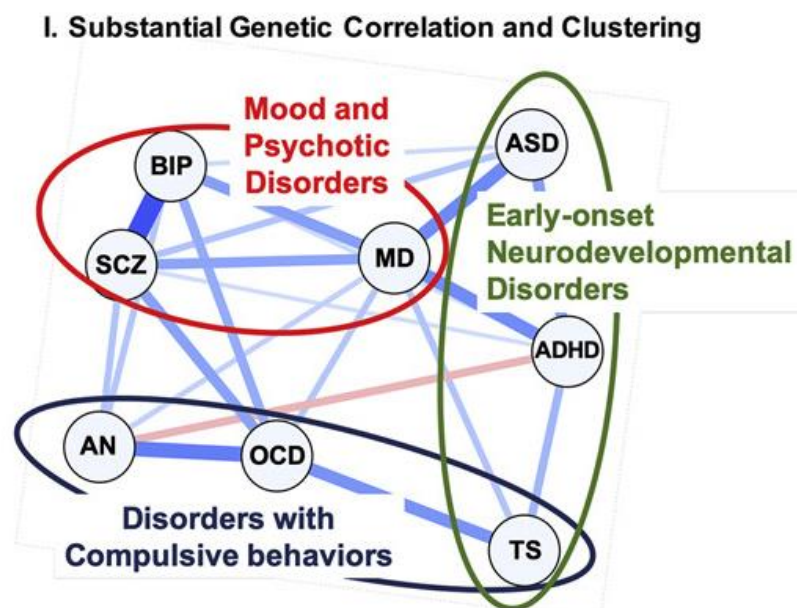


Figura 5 Correlações genéticas e agrupamento entre oito transtornos psiquiátricos. Figura adaptada de *Brainstorm Consortium* 2019.

Também é possível testar o compartilhamento de bases genéticas entre dois fenótipos diferentes avaliando sua arquitetura poligênica através de PRS. Nesse caso, é possível detectar associações entre a carga de risco genético para uma característica, por exemplo, TDAH e outra característica como o TEA. Alguns estudos têm explorado essa perspectiva, com resultados apontando escores de risco derivados do TDAH associados com habilidades pragmáticas de linguagem (um traço fenotípico relacionado com TEA) (Martin et al., 2014) e sintomas de autismo em uma amostra populacional (Riglin et al., 2020).

#### **1.2.4 Estudos de variantes raras e sequenciamento de exoma**

Apesar do enfoque no efeito das variantes genéticas comuns e seu papel na etiologia desses fenótipos, um crescente conjunto de evidências acerca do papel de variantes raras na fisiopatologia dos Transtornos do Neurodesenvolvimento sugere que esse tipo de variação genética, ainda que pouco estudada, não deve de forma alguma ser negligenciado. Como descrito anteriormente, a parcela da herdabilidade que pode ser explicada apenas com efeitos aditivos de variantes comuns tanto do TDAH quanto do TEA está muito aquém às estimativas de herdabilidade derivadas dos estudos com gêmeos (Demontis et al. 2019; Chang et al. 2013; Larsson et al. 2014). Desse modo, sugere-se que outros mecanismos genéticos mais complexos, os quais incluem o papel das variantes raras - incluindo, por exemplo, variantes do número de cópias (CNVs, do inglês *copy number variants*) e mutações de ponto de alto impacto funcional - possam estar atuando na susceptibilidade genética dos Transtornos do Neurodesenvolvimento (Purper-Ouakil et

al. 2011; Sanders et al. 2017; Höglund et al. 2019). A inclusão dessa fonte de variação pode futuramente aumentar significativamente as estimativas de herdabilidade molecular explicada como foi sugerido recentemente para medidas de índice de massa corporal e de altura (Wainschtein et al. 2019).

Ainda assim, até a presente Tese o papel de variantes genéticas raras foi muito menos investigado no TDAH do que no TEA. Ao passo que inúmeros estudos já tenham implicado um conjunto de mais de 100 genes enriquecidos em variantes raras no TEA (Balicza et al. 2019; Ruzzo et al. 2019; Satterstrom et al. 2020), onde a coleção de genes implicados sugere importante papel de rotas biológicas relacionadas à função neuronal, esses esforços com relação ao TDAH ainda estão em suas etapas iniciais. As primeiras tentativas de abordar o papel das variantes raras na suscetibilidade ao TDAH concentraram-se no estudo de CNVs. Neste contexto, vários estudos sugeriram uma carga aumentada de CNVs grandes (normalmente > 500kb) entre os indivíduos com TDAH em comparação aos controles (Williams et al. 2010; Lesch et al. 2011; Ramos-Quiroga et al. 2014; Martin et al. 2015).

Apenas recentemente, a partir também de uma maior viabilidade financeira, a busca de variantes raras potencialmente envolvidas na susceptibilidade ao TDAH tem incluído também às análises de sequenciamento, especialmente o sequenciamento do exoma. Esse tipo de análise tem como intuito, através da identificação de outra classe de variantes raras (variantes de nucleotídeo único), sugerir o envolvimento de novos genes e novas rotas biológicas na etiologia dos Transtornos do Neurodesenvolvimento.



A detecção de variantes genéticas com baixa frequência alélica na população adiciona um grande nível de complexidade aos estudos genéticos, principalmente em relação à dificuldade de se obter poder estatístico adequado. Nesse sentido, estudos focados na análise de variantes raras utilizam estratégias adicionais considerando o impacto, a frequência e o agrupamento em genes de tais variantes (Wu et al. 2011; Lee et al. 2012). Em geral os estudos têm utilizado uma metodologia com enfoque em priorizar certos tipos de variantes, em sua maioria aquelas consideradas de alto impacto funcional. Variantes caracterizadas como de alto impacto envolvem variantes genéticas para as quais hipotetizamos um grande impacto no fenótipo como as variantes dos tipos: sem sentido (*non-sense/stop gain*), de mudança no quadro de leitura (*frameshift*), aquelas que afetam regiões de *splicing*, além de variantes de sentido trocado (*missense*) com grande efeito na proteína. Ainda, existe uma forte relação entre o impacto funcional de uma variante e a sua frequência alélica na população humana, onde a frequência das variantes deletérias é reduzida através do processo de seleção natural.

Da mesma forma que os estudos avaliando o papel de variantes comuns na susceptibilidade dos transtornos, esses estudos também podem seguir hipóteses *a priori*, serem livres de hipóteses ou apresentarem um desenho híbrido. Até o momento, um número limitado de estudos utilizou o sequenciamento de exoma na busca de variantes raras, e os resultados obtidos revelaram poucas informações sobre as variantes raras e os genes associadas ao transtorno (Demontis et al. 2016; Zayats et al. 2016; Corominas et al. 2018; Satterstrom et al. 2019; Al-Mubarak et al. 2020). Ainda assim, um excesso de variantes raras foi observado tanto em um conjunto predefinido de genes candidatos (Demontis et al. 2016), em genes identificados previamente em análises de família

(Corominas et al. 2018; Al-Mubarak et al. 2020) ou em um estudo livre de hipótese (Satterstrom et al. 2019).

# Capítulo 2: Justificativa e Objetivos



*"...this is not a moment, it's the movement.."*

*"...and I am not throwing away my shot..."*

Lin-Manuel Miranda

In: Hamilton – My shot

## 2.1 Justificativa

Há um interesse social, científico e econômico notável em ampliar a compreensão e aperfeiçoar o tratamento de transtornos mentais, uma vez que eles podem ter graves impactos na vida dos pacientes afetados e de suas famílias. Desde 1960 estamos cada vez mais cientes da importância dos fatores genéticos na etiologia dos transtornos do neurodesenvolvimento. As altas estimativas de herdabilidade para esses transtornos geraram uma grande expectativa de que seria relativamente simples identificar diferentes genes e variantes de risco associados. Após várias décadas de investigação, está evidente que a arquitetura genética relacionada a esses transtornos é extremamente poligênica. Entretanto, apesar do grande número de polimorfismos associados em diferentes genes, a parcela da variabilidade genética que pode ser explicada por essas associações ainda está muito aquém do esperado.

Ao longo desses anos, seguindo os avanços técnicos e metodológicos na genética, muitas abordagens complementares foram desenvolvidas. Assim, ainda existe grande potencial para avançar nossa compreensão da etiologia dos Transtornos do Neurodesenvolvimento, englobando estudos de genes candidato, de variação comum no genoma, de identificação outros tipos de variantes, além de um repertório extenso de ferramentas estatísticas e bioinformática.

Além da integração de diferentes fontes de evidência, uma perspectiva cada vez mais presente na tentativa de elucidar a complexa arquitetura genética dos transtornos psiquiátricos é a inclusão e avaliação de fatores relacionados à heterogeneidade clínica dos mesmos. Assim, utilizar diferentes abordagens que contemplem esses aspectos, tais

como o estudo de sintomas e características clínicas, incluindo as suas trajetórias, pode apontar para mecanismos neurobiológicos envolvidos na fisiopatologia dos transtornos.

Nesse sentido, a presente tese se insere dentro desse contexto e utiliza diferentes abordagens genéticas e fenotípicas a fim de contribuir para o conhecimento do papel dos mecanismos moleculares subjacentes aos Transtornos do Neurodesenvolvimento.

## 2.2 Objetivos

Dessa forma, nosso principal objetivo foi contribuir para os esforços no campo da genética psiquiátrica, buscando elucidar fatores associados à arquitetura genética de dois transtornos do neurodesenvolvimento (TDAH e TEA) e suas manifestações clínicas e possíveis influências pleiotrópicas entre eles por meio de diversas abordagens em genética molecular e estatística. Para isso, os objetivos específicos desta tese abordam duas grandes frentes.

1. A primeira engloba os esforços de investigação de fatores genéticos comuns relacionados a aspectos etiológicos dos Transtornos do Neurodesenvolvimento, incluindo:

- 1.1. Testar a associação de uma variante genética de um gene candidato amplamente associado ao TDAH (*ADGRL3*) em duas amostras clássicas de transtornos do neurodesenvolvimento, homens com padrão persistente de TDAH e meninos com TEA, aferindo potenciais fatores genéticos compartilhados entre os fenótipos (Capítulo 3);

1.2. Explorar em uma perspectiva genômica, se o risco genético baseado em variantes genéticas comuns para o TEA, indexado na forma escores de risco poligênico, está associado ao TDAH e sua manifestação clínica (Capítulo 4);

1.3. Identificar quais aspectos fenotípicos e de trajetória clínica do TDAH melhor refletem o componente genético compartilhado com outro transtorno do neurodesenvolvimento (Capítulo 4);

2. Na segunda, buscamos avaliar possíveis contribuições de outros fatores que não variantes comuns, comumente relacionados a outros transtornos do neurodesenvolvimento, no substrato genético do TDAH. Em específico:

2.1. Realizar a análise exploratória por sequenciamento de exoma a fim de identificar variantes raras de alto impacto de indivíduos com a forma persistente do TDAH (Capítulo 5);

2.2. Caracterizar, através de padrões de expressão e enriquecimento funcional em vias biológicas, o papel dos genes com excesso de variantes raras identificados na análise de exoma (Capítulo 5);

2.3. Avaliar o papel de variantes comuns no conjunto de genes identificados pela análise de variantes raras, por meio de análises de sets gênicos, em duas grandes amostras independentes de indivíduos com TDAH e traços fenotípicos do transtorno na população (Capítulo 5).

## Capítulo 3


### ***ADGRL3* rs6551665 as a Common Vulnerability Factor Underlying Attention- Deficit/Hyperactivity Disorder and Autism Spectrum Disorder**

*NeuroMolecular Medicine* (2019) 21:60–67





# ADGRL3 rs6551665 as a Common Vulnerability Factor Underlying Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Autism Spectrum Disorder

Djenifer B. Kappel<sup>1,2</sup> · Jaqueline B. Schuch<sup>1,2,3</sup> · Diego L. Rovaris<sup>1,2</sup> · Bruna S. da Silva<sup>1,2</sup> · Diana Müller<sup>1,2</sup> · Vitor Breda<sup>2,4</sup> · Stefania P. Teche<sup>2,4</sup> · Rudimar S. Riesgo<sup>5</sup> · Lavínia Schüler-Faccini<sup>1</sup> · Luís A. Rohde<sup>2,4,6</sup> · Eugenio H. Grevet<sup>2,4</sup> · Claiton H. D. Bau<sup>1,2</sup> 

Received: 28 March 2018 / Accepted: 10 January 2019 / Published online: 16 January 2019  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

## Abstract

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

**Keywords** ADHD · ASD · *ADGRL3* · *LPHN3* · Neurodevelopment · Sex-specific effects

## Introduction

Neurodevelopmental disorders, as characterized by DSM-5, include a group of neuropsychiatric conditions that generally manifest symptoms before adolescence, follow a stable

course throughout adulthood and are more prevalent in males (APA 2013; Thapar et al. 2015). Among these, Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) and Autism Spectrum Disorder (ASD) are some of the most common and more classical examples of neurodevelopmental disorders (APA 2013). While ADHD is characterized by the presence of attentional problems and a pattern of hyperactivity and impulsivity, ASD manifests by impairment in the

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12017-019-08525-x>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Claiton H. D. Bau  
claiton.bau@ufrgs.br

- <sup>1</sup> Department of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, RS CEP: 91501-970, Brazil
- <sup>2</sup> ADHD Outpatient Program – Adult Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil
- <sup>3</sup> Graduate Program in Biomedical Gerontology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

- <sup>4</sup> Department of Psychiatry, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
- <sup>5</sup> Child Neurology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
- <sup>6</sup> National Institute of Developmental Psychiatry for Children and Adolescents, Porto Alegre, Brazil



development of social skills and communication, and the presence of stereotypical behaviors. The two diagnoses are not mutually exclusive and frequently occur in comorbidity (Sokolova et al. 2017; Zablotsky et al. 2017). Furthermore, these disorders seem to share a common genetic background (Ghirardi et al. 2018; Lichtenstein et al. 2010; Pettersson et al. 2013; Rommelse et al. 2011).

In spite of the high heritability estimates for ADHD (76%) (Brikell et al. 2015; Chang et al. 2013) and ASD (80%) (Ronald and Hoekstra 2011; Tick et al. 2016), and the increasingly larger samples, only a few genome-wide significant hits have been reported, which contribute to only a small part of the overall heritability (Autism Spectrum Disorders Working Group of The Psychiatric Genomics Consortium 2017; Demontis et al. 2018). Also, the replication of these findings is inconsistent, rendering the genetic architecture underlying these neurodevelopmental disorders still largely unknown. Apart from this, classical candidate genes have emerged as potential biological substrates involved in the development of ADHD and ASD, and some of these genes presented pleiotropic effects being associated with both disorders (Akutagava-Martins et al. 2016; Chen et al. 2015; Gilbert and Man 2017; Hawi et al. 2015).

Neurodevelopmental processes are essential to brain functioning, requiring highly regulated cell guidance events (Jackson et al. 2016). These processes depend on a small number of cell guidance receptors and are influenced by genetic variation (Tau and Peterson 2010). For instance, the dysregulation of axon guidance and neurite outgrowth processes were suggested to be involved in ADHD etiology (Poelmans et al. 2011) and more recently in ASD as well (Gilbert and Man 2017). Specific genes involved in these processes have been largely studied in neurodevelopmental disorders. Among those, a promising candidate gene involved in a range of functions related to the development of the central nervous system (CNS) is *ADGRL3*. This gene encodes a protein shown to modulate interactions between adjacent neurons, thus affecting axon guidance, synaptogenesis and synaptic plasticity (Meza-Aguilar and Boucard 2014).

ADHD and ASD present a pattern of biased prevalence towards males. The underlying reasons for this phenomenon are poorly understood, but current evidence points to an involvement of brain morphology differences (Motttron et al. 2015; Park et al. 2018; Ruigrok et al. 2014), brain maturational delays (Koolschijn and Crone 2013), differential effects of sex-hormones and sex-chromosomes (Davies 2014; Davies and Wilkinson 2006; Loke et al. 2015; Mitra et al. 2016), neuroinflammation (McCarthy 2016), and sex-biased DNA methylation (Nugent et al. 2015) and gene expression (Loke et al. 2015; Ruigrok et al. 2014). The differential prevalence of these disorders and the evidence for distinct patterns of brain morphology and function

between males and females raise the possibility of sex-specific underlying genetic factors (Gobinath et al. 2017). Recent studies point to a multifactorial liability threshold model, with a protective effect in females, derived from the need to present a greater burden of genetic risk in order to manifest either ADHD or ASD (Gilman et al. 2011; Jacquemont et al. 2014; Martin et al. 2017; Taylor et al. 2016) and also suggest the presence of sex-genotype interactions (Mitra et al. 2016).

*ADGRL3* expression is highly specific and regulated during brain development, peaking in the prenatal and postnatal periods (Arcos-Burgos et al. 2010; Haitina et al. 2008; Xing et al. 2009). Its important role in synaptic development and the timely expression pattern suggest that disruptions in gene expression or protein functioning affect individuals earlier in life and produce persistent effects throughout life. Noteworthy, the protein is expressed in brain areas known to present differential volume measures according to sex (Ruigrok et al. 2014) and to be involved in ADHD and ASD, such as the amygdala, cerebellum and cerebral cortex (Arcos-Burgos et al. 2010). In this sense, the implications of *ADGRL3* regulatory role in CNS developmental mechanisms in the emergence of neurodevelopmental psychiatric conditions are especially relevant in the context of male neurodevelopment.

Furthermore, *ADGRL3* has been repeatedly associated with ADHD in several samples, from different clinical and genetic backgrounds (Acosta et al. 2016; Arcos-Burgos et al. 2010; Bruxel et al. 2015; Choudhry et al. 2012; Gomez-Sanchez et al. 2016; Hwang et al. 2015; Ribasés et al. 2011). These findings are also supported by genome-wide linkage findings (Arcos-Burgos et al. 2004) and by animal models that implicate *ADGRL3* in ADHD pathophysiology (Lange et al. 2012; Orsini et al. 2016; Reuter et al. 2016; van der Voet et al. 2015; Wallis et al. 2012). One specific variant (rs651665) has been extensively studied and associated with ADHD in a meta-analysis (Arcos-Burgos et al. 2010). This variant was also shown to influence the severity of ADHD symptoms and the response to treatment with stimulants (Arcos-Burgos et al. 2010; Bruxel et al. 2015; Choudhry et al. 2012). Interestingly, these results derive from studies of ADHD in children, while replication attempts in adults have not retrieved the same findings (Arcos-Burgos et al. 2010; Kappel et al. 2017).

Considering previous evidence implicating variants from *ADGRL3* in ADHD, mostly in its early-onset form, its role in the proper development of the central nervous system, its differential expression considering developmental periods and sexually dimorphic brain regions, and the substantial shared genetic risk between neurodevelopmental disorders, we aimed to assess the influence of *ADGRL3*—rs651665 in two acknowledged neurodevelopmental disorders: males with early-onset ADHD and boys with ASD.

## Methods

### Subjects

#### ASD Sample

The ASD sample consists of 135 male patients recruited at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and/or other medical and educational institutions of the State of Rio Grande do Sul, Brazil (Schuch et al. 2014). Individuals were diagnosed with idiopathic ASD by experienced and trained neuropsychiatrists in regular appointments (on average 3–4 appointments) according to the DSM-IV criteria (APA 1994). Exclusion criteria were the presence of Fragile X syndrome or other genetic syndromes, chromosomal abnormalities and lesional abnormalities of the CNS. All individuals included were white Brazilians of European descent. Mean age of ASD patients was 9.1 years (SD = 4.5). The complete research protocol has been described elsewhere (Longo et al. 2009; Schuch et al. 2014).

#### ADHD Sample

The ADHD sample comprises 187 adult males (18 years or older), recruited from the Adult Division of the ADHD Outpatient Clinic at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Individuals were diagnosed with ADHD by trained psychiatrists through the application of clinical and semi-structured interviews following DSM-IV criteria for ADHD (APA 1994). Individuals included in this study fulfilled full DSM-IV criteria, including the age of ADHD onset before 7 years of age, confirmed with collateral information. Exclusion criteria were the age of ADHD onset between 7 and 12 years old, clinically significant history of neurological disease (e.g., delirium, dementia, epilepsy, head trauma, multiple sclerosis), past or present symptoms of psychosis and an estimated IQ < 70. All individuals included were white Brazilians of European descent, and the average age at assessment was 31.9 years (SD = 10.6).

#### Control Subjects

A sample of 468 adult males with negative screening for ADHD in the 6-question Adult ADHD Self-Rated Screener (ASRS) (Kessler et al. 2005) and no diagnosis of ASD composes our control group. Individuals were blood donors recruited at the same hospital where all cases were ascertained. Control subjects average age was 31.8 years (SD = 10.5).

The ethics committee of HCPA approved the study, and informed consent was obtained from all subjects or legal representatives.

### Genotyping

DNA was extracted from peripheral blood by salting out (Lahiri and Nurnberger Jr 1991). One SNP (rs6551665—Chr 4:61873823, A/G—intronic) in the *ADGRL3* gene was selected and genotyped by TaqMan allelic discrimination assays (Applied Biosystems) according to the manufacturer's suggested protocol. This polymorphism was selected according to previous evidence of genetic association with ADHD (meta-analysis in Arcos-Burgos et al. 2010) and minor allele frequency in the European population above 15%. In order to assure genotyping quality control, approximately 10% of the sample was re-genotyped with no inconsistencies found. Allelic frequencies are in Hardy–Weinberg equilibrium in all samples. Analyses considering the main effect of *ADGRL3*—rs6551665 and interactions with SNPs in the *NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2* cluster in ADHD have been reported previously (Kappel et al. 2017).

### Statistical Analyses

Logistic regression analyses were performed to assess the effects of *ADGRL3*—rs6551665 regarding both ADHD and ASD susceptibility, and to general susceptibility to neurodevelopmental disorders (i.e., ADHD and ASD combined). Given the sample size and allele frequencies, a dominant model, where heterozygotes were combined with the less frequent homozygotes, was used for these analyses.

### In Silico Functionality Prediction

In order to explore the potential effects of the intronic variant rs6551665 in the functionality of *ADGRL3*, we performed an in silico prediction of regulatory mechanisms involved in gene expression. We interrogated the publicly available regulatory databases—HaploReg v4.1 (Ward and Kellis 2012) and RegulomeDB (Boyle et al. 2012). HaploReg is a web-based database aimed at exploring the impact of noncoding variants on clinical phenotypes through its effects on gene expression regulatory mechanisms. It contains information regarding chromatin state, histone modifications and protein binding annotation. Similarly, RegulomeDB annotates SNPs with known and predicted regulatory elements in intergenic regions; some of its integrated data overlaps with HaploReg but it also generates a score (range 1–7) suggesting the likelihood of regulatory evidence for each locus.

## Results

We observed an association between *ADGRL3*—rs6551665 and ADHD susceptibility in males with early onset of ADHD symptoms. The presence of the minor G allele (i.e., AA vs. AG + GG) was associated with an increased risk of ADHD in this sample ( $p = 0.025$ ; OR 1.502) (Table 1).

Additionally, in the susceptibility study in boys with ASD, we also observed an association of *ADGRL3*—rs6551665 and the disorder. A similar pattern to the one observed in ADHD arises, where the presence of at least one minor G allele confers increased risk to ASD development ( $p = 0.044$ ; OR 1.511) (Table 1).

Finally, as expected based on the analyses with each disorder, in the combined analysis of both neurodevelopmental disorders we observed a stronger association with the presence of the minor G allele in *ADGRL3*—rs6551665 ( $p = 0.007$ ; OR 1.500) (Table 1).

We explored the effects of rs6551665 on *ADGRL3* through an in silico prediction analyses. HaploReg suggests that rs6551665 is involved in gene expression regulatory mechanisms especially in brain tissues, consistent with the fact that *ADGRL3* is mainly expressed in the brain. Chromatin state data suggest that rs6551665 is related to enhancer activity in almost all brain tissues evaluated (hippocampus, substantia nigra, inferior temporal lobe, angular gyrus, and germinal matrix). Furthermore, this analysis also suggests that the SNP appears to be associated with an active transcription initiation site in the anterior caudate brain region (Supplementary file 1). Different histone marks are detected at rs6551665 locus (H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac and H3K9ac); the presence of H3K27Ac, often found near regulatory elements, suggests that the loci could have a role as regulatory enhancer region. This set of results is also observed in RegulomeDB; the database score of 5 suggests that rs6551665 is placed in an enhancer region but has an overall minimal transcription factor binding evidence.

## Discussion

The results presented here suggest that *ADGRL3* could be part of a common genetic etiology for ADHD and ASD, being implicated in the underlying neurobiology of two common neurodevelopmental disorders. These results derive from an integrative approach that acknowledges the substantial shared genetic risk between psychiatric disorders and highlight the importance of study designs that accommodate and investigate specific overlapping genetic factors that can give rise to a range of diagnoses.

**Table 1** Logistic regression analyses regarding the influence of *ADGRL3*—rs6551665 on ADHD and ASD

	Genotype	Controls n (%)	Neurodevelop- mental disorders <sup>b</sup> n (%)	Odds Ratio (CI 95%) <sup>a</sup>	p-value	ADHD n (%)	Odds Ratio (CI 95%) <sup>a</sup>	p-value	ASD n (%)	Odds Ratio (CI 95%) <sup>a</sup>	p-value
<i>ADGRL3</i> —rs6551665	AA	197 (42.1)	105 (32.6)	1.500 (1.120–2.020)	0.007	61 (32.6)	1.502 (1.051–2.145)	0.025	44 (32.6)	1.511 (1.009–2.263)	0.044
	G-carriers	271 (57.9)	217 (67.4)			126 (67.4)			91 (67.4)		

*ADHD* Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder, *ASD* Autism Spectrum Disorder

<sup>a</sup>Confidence interval 95%

<sup>b</sup>Neurodevelopmental disorders (combined group with ADHD or ASD)



The overall evidence and present findings may be useful to interpret *ADGRL3* influence in neurodevelopmental conditions. *ADGRL3*'s linkage (Arcos-Burgos et al. 2004) and association (Acosta et al. 2016; Arcos-Burgos et al. 2010; Bruxel et al. 2015; Choudhry et al. 2012; Gomez-Sanchez et al. 2016; Huang et al. 2018; Hwang et al. 2015; Ribasés et al. 2011) in childhood ADHD has been extensively demonstrated; we provide further evidence that this gene is involved in the neurobiological substrate of the disorder in a sample of adult males with early-onset ADHD. This result is especially interesting since these subjects comprise a sample with an early-onset of ADHD symptoms and a stable clinical phenotype throughout adulthood, characterizing a classical neurodevelopmental disorder (Thapar et al. 2015). Although not formally investigated, the suggestive involvement of *ADGRL3* in ASD neurobiology observed in this study is not entirely new. A copy number variation investigation in a child with ASD detected a large duplication in the region encompassing the gene (Gau et al. 2012). Interestingly, this same individual presented several symptoms of inattention and hyperactivity. Moreover, a linkage study showed a significant signal for the *ADGRL3* genomic region in dyslexia, another neurodevelopmental disorder (Field et al. 2013).

The influence of *ADGRL3* in neurodevelopmental disorders could be related to its role in synapse development. *ADGRL3* encodes a transmembrane adhesion G protein-coupled receptor, having an especially important function during synaptic development (O'Sullivan et al. 2014). Through its olfactomedin-like domain, *ADGRL3* interacts with fibronectin leucine-rich repeat transmembrane 3 protein (FLRT3), forming a trans-synaptic complex (O'Sullivan et al. 2012, 2014). This binding is required to support glutamatergic synapse development, and therefore, it is implicated in the development of the nervous system. The formation of these complexes suggests that *ADGRL3* is responsible for establishing accurate glutamatergic signaling during development. Another interesting point is that glutamatergic neurotransmitter system variants and genes have been implicated in both ADHD and ASD (Akutagawa-Martins et al. 2014; Chiocchetti et al. 2014, 2018; Elia et al. 2011; Hadley et al. 2014; Mariani et al. 2015; Naaijen et al. 2017; Noroozi et al. 2016; Uzunova et al. 2014). In this sense, the effects of *ADGRL3* in the formation of these specific synapses, through its interactions with FLRT3, could be a potential mechanism related to the neurodevelopmental origins of ADHD and ASD.

These results should be taken in the context of some limitations. Firstly, only the new DSM-5 criteria allow the comorbidity of ADHD and ASD in index cases of both disorders. The samples of this study were collected under DSM-IV criteria, a classificatory system that did not allow the presence of ADHD-ASD comorbidity. Future studies

should address the association of both disorders and investigate whether the effect size of the association reported here could be even stronger in individuals diagnosed with both disorders. Secondly, the control group was not age-paired with the individuals with ASD, but they did not present a diagnosis of neither ADHD nor ASD until adulthood. Also, our study design, comprising only male samples of ADHD and ASD, hinders the extrapolation of the present results to female samples. However, since a previous study did not detect a main effect in ADHD (Kappel et al. 2017), it is unlikely that this variant might have a significant role in this group. Similarly designed studies with larger sample sizes and also evaluating these genetic effects in females with autism are necessary. Finally, *ADGRL3*—rs6551665 is an intronic variant and its exact molecular effect and consequent role in biological mechanisms is still unknown. A screening of potential mutations in the *ADGRL3* gene in patients with ADHD revealed that its effect is most likely caused by a partial reduction of gene activity, and not by a complete loss of function (Domené et al. 2011). Therefore, the *ADGRL3* variant studied herein (rs6551665) could be exerting its effects through regulatory mechanisms related to gene expression as suggested by the *in silico* predictions. According to previous work (Domené et al. 2011), we could hypothesize that subtle changes in protein expression and availability influence underlying neurobiological mechanisms through *ADGRL3* direct role or through the trans-synaptic complex formation with FLRT3 (O'Sullivan et al. 2012). Alternatively, considering that several studies have identified other *ADGRL3* variants also associated with neurodevelopmental disorders (Acosta et al. 2016; Bruxel et al. 2015; Choudhry et al. 2012; Huang et al. 2018; Martinez et al. 2016; Ribasés et al. 2011), it is also possible that we are capturing the by-proxy effect of another functional variant in linkage disequilibrium.

In conclusion, these results add to the increasing amount of knowledge depicting the role of neurodevelopmental genes in the substrate of ADHD and ASD. The overall state-of-the-art suggests that *ADGRL3* might be a gene deeply involved in the development of the brain, and its genetic modifications might be part of a common vulnerability factor related to neurodevelopmental disorders, which in turn can manifest, depending on the remaining genetic background as different disorders like ADHD and ASD. Nevertheless, the evidence presented here warrants the need for future studies that acknowledge and investigate *ADGRL3* pleiotropic effects and possible influence in other neuropsychiatric and neurodevelopmental disorders.

**Acknowledgements** We would like to thank the ProDAH-A team, the clinical staff at the Child Neurology Unit and all the individuals with ADHD, ASD and blood donors that participated in this study. We also thank Dr. Sandra Leistner-Segal at Medical Genetics Service from Hospital de Clínicas de Porto Alegre for the fragile X syndrome

genotyping. This work received financial support from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 424041/2016-2, 466722/2014-1, 476529/2012-3, and 484403/2007-9), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, AUX-PE-PROEX-1234/2011 and 376/2009) and Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA 100358, 08543 and 05451).

**Funding** The funding agencies were not involved in study design, data collection, analysis or interpretation of data, writing the report or in the decision to submit the article for publication.

## Compliance with Ethical Standards

**Conflict of interest** The author(s) declare the following potential conflict of interest with respect to the research, authorship and/or publication of this article: Dr. Grevet was on the speaker's bureau for Novartis and Shire for the last 3 years. Dr. Rohde has received Honoraria, has been on the speakers' bureau/advisory board and/or has acted as a consultant for Eli-Lilly, Janssen-Cilag, Medice, Novartis and Shire in the last three years. He receives authorship royalties from Oxford Press and ArtMed. The ADHD and Juvenile Bipolar Disorder Outpatient Programs chaired by him received unrestricted educational and research support from the following pharmaceutical companies in the last three years: Eli-Lilly, Janssen-Cilag, Novartis, and Shire. All other authors report no biomedical financial interests or potential conflicts of interest.

**Ethical Approval** All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

## References

- Acosta, M. T., Swanson, J., Stehli, A., Molina, B. S. G., Martinez, A. F., Arcos-Burgos, M., & Muenke, M. (2016). *ADGRL3* (*LPHN3*) variants are associated with a refined phenotype of ADHD in the MTA study. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 3, 1–8. <https://doi.org/10.1002/mgg3.230>.
- Akutagava-Martins, G. C., Rohde, L. A., & Hutz, M. H. (2016). Genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: An update. *Expert review of neurotherapeutics*, 16(2), 145–156. <https://doi.org/10.1586/14737175.2016.1130626>.
- Akutagava-Martins, G. C., Salatino-Oliveira, A., Genro, J. P., Contini, V., Polanczyk, G., Zeni, C., et al. (2014). Glutamatergic copy number variants and their role in attention-deficit/hyperactivity disorder. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics*, 165B(6), 502–509. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32253>.
- American Psychiatric Association (APA). (1994). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-IV)*. Washington: American Psychiatric Pub.
- American Psychiatric Association (APA). (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5)*. Washington: American Psychiatric Pub.
- Arcos-Burgos, M., Castellanos, F. X., Pineda, D., Lopera, F., Palacio, J. D., Palacio, L. G., et al. (2004). Attention-deficit/hyperactivity disorder in a population isolate: linkage to loci at 4q13.2, 5q33.3, 11q22, and 17p11. *American Journal of Human Genetics*, 75(6), 998–1014. <https://doi.org/10.1086/426154>.
- Arcos-Burgos, M., Jain, M., Acosta, M. T., Shively, S., Stanescu, H., Wallis, D., et al. (2010). A common variant of the latrophilin 3 gene, *LPHN3*, confers susceptibility to ADHD and predicts effectiveness of stimulant medication. *Molecular Psychiatry*, 15(11), 1053–1066. <https://doi.org/10.1038/mp.2010.6>.
- Autism Spectrum Disorders Working Group of The Psychiatric Genomics Consortium. (2017). Meta-analysis of GWAS of over 16,000 individuals with autism spectrum disorder highlights a novel locus at 10q24.32 and a significant overlap with schizophrenia. *Molecular Autism*, 8, 21. <https://doi.org/10.1186/s13229-017-0137-9>.
- Boyle, A. P., Hong, E. L., Hariharan, M., Cheng, Y., Schaub, M. A., Kasowski, M., et al. (2012). Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Research*, 22(9), 1790–1797. <https://doi.org/10.1101/gr.137323.112>.
- Brikell, I., Kuja-Halkola, R., & Larsson, H. (2015). Heritability of attention-deficit hyperactivity disorder in adults. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics*. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32335>.
- Bruxel, E. M., Salatino-Oliveira, A., Akutagava-Martins, G. C., Tovo-Rodrigues, L., Genro, J. P., Zeni, C. P., et al. (2015). *LPHN3* and attention-deficit/hyperactivity disorder: A susceptibility and pharmacogenetic study. *Genes, Brain and Behavior*, 14(5), 419–427. <https://doi.org/10.1111/gbb.12224>.
- Chang, Z., Lichtenstein, P., Asherson, P. J., & Larsson, H. (2013). Developmental twin study of attention problems: High heritabilities throughout development. *JAMA Psychiatry*, 70(3), 311–318. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.2871555120> [pii].
- Chen, J. A., Peñagarikano, O., Belgard, T. G., Swarup, V., & Geschwind, D. H. (2015). The emerging picture of autism spectrum disorder: Genetics and pathology. *Annual Review of Pathology*, 10, 111–144. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012414-040405>.
- Chiocchetti, A. G., Bour, H. S., & Freitag, C. M. (2014). Glutamatergic candidate genes in autism spectrum disorder: An overview. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 121(9), 1081–1106. <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1161-y>.
- Chiocchetti, A. G., Yousaf, A., Bour, H. S., Haslinger, D., Waltes, R., Duketis, E., et al. (2018). Common functional variants of the glutamatergic system in Autism spectrum disorder with high and low intellectual abilities. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 125(2), 259–271. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1813-9>.
- Choudhry, Z., Sengupta, S. M., Grizenko, N., Fortier, M. E., Thakur, G. A., Bellingham, J., & Joobor, R. (2012). *LPHN3* and attention-deficit/hyperactivity disorder: Interaction with maternal stress during pregnancy. *Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines*, 53(8), 892–902. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.2012.02551.x>.
- Davies, W. (2014). Sex differences in attention deficit hyperactivity disorder: Candidate genetic and endocrine mechanisms. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 35(3), 331–346. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.03.003>.
- Davies, W., & Wilkinson, L. S. (2006). It is not all hormones: Alternative explanations for sexual differentiation of the brain. *Brain Research*, 1126(1), 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.09.105>.
- Demontis, D., Walters, R. K., Martin, J., Mattheisen, M., Als, T. D., Agerbo, E., et al. (2018). Discovery of the first genome-wide significant risk loci for attention deficit/hyperactivity disorder. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0269-7>.
- Domené, S., Stanescu, H., Wallis, D., Tinloy, B., Pineda, D. E., Kleta, R., et al. (2011). Screening of human *LPHN3* for variants with a potential impact on ADHD susceptibility. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 156(1), 11–18. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.31141>.
- Elia, J., Glessner, J. T., Wang, K., Takahashi, N., Shtir, C. J., Hadley, D., et al. (2011). Genome-wide copy number variation study



- associates metabotropic glutamate receptor gene networks with attention deficit hyperactivity disorder. *Nature Genetics*, 44(1), 78–84. <https://doi.org/10.1038/ng.1013>.
- Field, L. L., Shumansky, K., Ryan, J., Truong, D., Swiergala, E., & Kaplan, B. J. (2013). Dense-map genome scan for dyslexia supports loci at 4q13, 16p12, 17q22; suggests novel locus at 7q36. *Genes, Brain and Behavior*, 12(1), 56–69. <https://doi.org/10.1111/gbb.12003>.
- Gau, S. S. F., Liao, H. M., Hong, C. C., Chien, W. H., & Chen, C. H. (2012). Identification of two inherited copy number variants in a male with autism supports two-hit and compound heterozygosity models of autism. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 159 B(6), 710–717. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32074>.
- Ghirardi, L., Brikell, I., Kuja-Halkola, R., Freitag, C. M., Franke, B., Asherson, P., et al. (2018). The familial co-aggregation of ASD and ADHD: A register-based cohort study. *Molecular Psychiatry*, 23(2), 257–262. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.17>.
- Gilbert, J., & Man, H.-Y. (2017). Fundamental elements in autism: From neurogenesis and neurite growth to synaptic plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 359. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00359>.
- Gilman, S. R., Iossifov, I., Levy, D., Ronemus, M., Wigler, M., & Vitkup, D. (2011). Rare de novo variants associated with autism implicate a large functional network of genes involved in formation and function of synapses. *Neuron*, 70(5), 898–907. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.021>.
- Gobinath, A. R., Choleris, E., & Galea, L. A. M. (2017). Sex, hormones, and genotype interact to influence psychiatric disease, treatment, and behavioral research. *Journal of Neuroscience Research*, 95(1–2), 50–64. <https://doi.org/10.1002/jnr.23872>.
- Gomez-Sanchez, C. I., Riveiro-Alvarez, R., Soto-Insuga, V., Rodrigo, M., Tirado-Requero, P., Mahillo-Fernandez, I., et al. (2016). Attention deficit hyperactivity disorder: Genetic association study in a cohort of Spanish children. *Behavioral and Brain Functions*, 12(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s12993-015-0084-6>.
- Hadley, D., Wu, Z.-L., Kao, C., Kini, A., Mohamed-Hadley, A., Thomas, K., et al. (2014). The impact of the metabotropic glutamate receptor and other gene family interaction networks on autism. *Nature Communications*, 5, 4074. <https://doi.org/10.1038/ncomms5074>.
- Haitina, T., Olsson, F., Stephansson, O., Alsiö, J., Roman, E., Ebendal, T., et al. (2008). Expression profile of the entire family of Adhesion G protein-coupled receptors in mouse and rat. *BMC Neuroscience*, 9, 43. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-9-43>.
- Hawi, Z., Cummins, T. D. R., Tong, J., Johnson, B., Lau, R., Samarray, W., & Bellgrove, M. A. (2015). The molecular genetic architecture of attention deficit hyperactivity disorder. *Molecular Psychiatry*, 20(3), 289–297. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.183>.
- Huang, X., Zhang, Q., Gu, X., Hou, Y., Wang, M., Chen, X., & Wu, J. (2018). LPHN3 gene variations and susceptibility to ADHD in Chinese Han population: A two-stage case-control association study and gene-environment interactions. *European child & adolescent psychiatry*. <https://doi.org/10.1007/s00787-018-1251-8>.
- Hwang, I. W., Lim, M. H., Kwon, H. J., & Jin, H. J. (2015). Association of LPHN3 rs6551665 A/G polymorphism with attention deficit and hyperactivity disorder in Korean children. *Gene*, 566(1), 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.04.033>.
- Jackson, V. A., Mehmood, S., Chavent, M., Roversi, P., Carrasquero, M., Del Toro, D., et al. (2016). Super-complexes of adhesion GPCRs and neural guidance receptors. *Nature Communications*, 7, 11184. <https://doi.org/10.1038/ncomms11184>.
- Jacquemont, S., Coe, B. P., Hersch, M., Duyzend, M. H., Krumm, N., Bergmann, S., et al. (2014). A higher mutational burden in females supports a “female protective model” in neurodevelopmental disorders. *American Journal of Human Genetics*, 94(3), 415–425. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.02.001>.
- Kappel, D. B., Schuch, J. B., Rovaris, D. L., da Silva, B. S., Cupertino, R. B., Winkler, C., et al. (2017). Further replication of the synergistic interaction between LPHN3 and the NTAD gene cluster on ADHD and its clinical course throughout adulthood. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.06.011>.
- Kessler, R. C., 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. *Psychological Medicine*, 35(2), 245–256. <https://doi.org/10.1017/S0033291704002892>.
- Koolschijn, P. C. M. P., & Crone, E. A. (2013). Sex differences and structural brain maturation from childhood to early adulthood. *Developmental Cognitive Neuroscience*, 5, 106–118. <https://doi.org/10.1016/j.dcn.2013.02.003>.
- Lahiri, D. K., & Nurnberger, J. I. Jr. (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research*, 19(19), 5444.
- Lange, M., Norton, W., Coolen, M., Chaminade, M., Merker, S., Proft, F., et al. (2012). The ADHD-susceptibility gene lphn3.1 modulates dopaminergic neuron formation and locomotor activity during zebrafish development. *Molecular Psychiatry*, 17(10), 946–954. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.29>.
- Lichtenstein, P., Carlström, E., Råstam, M., Gillberg, C., & Anckarsäter, H. (2010). The genetics of autism spectrum disorders and related neuropsychiatric disorders in childhood. *The American Journal of Psychiatry*, 167(11), 1357–1363. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2010.10020223>.
- Loke, H., Harley, V., & Lee, J. (2015). Biological factors underlying sex differences in neurological disorders. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 65, 139–150. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.05.024>.
- Longo, D., Schüller-Faccini, L., Brandalize, A. P. C., dos Santos Riesgo, R., & Bau, C. H. D. (2009). Influence of the 5-HTTLPR polymorphism and environmental risk factors in a Brazilian sample of patients with autism spectrum disorders. *Brain Research*, 1267, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.02.072>.
- Mariani, J., Coppola, G., Zhang, P., Abyzov, A., Provini, L., Tomasini, L., et al. (2015). FOXG1-dependent dysregulation of GABA/glutamate neuron differentiation in autism spectrum disorders. *Cell*, 162(2), 375–390. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.034>.
- Martin, J., Walters, R. K., Demontis, D., Mattheisen, M., Lee, S. H., Robinson, E., et al. (2017). A Genetic investigation of sex bias in the prevalence of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.11.026>.
- Martinez, A. F., Abe, Y., Hong, S., Molyneux, K., Yarnell, D., Löhr, H., et al. (2016). An ultraconserved brain-specific enhancer within ADGRL3 (LPHN3) underpins ADHD susceptibility. *Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.06.026>.
- McCarthy, M. M. (2016). Sex differences in the developing brain as a source of inherent risk. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 18(4), 361–372.
- Meza-Aguilar, D. G., & Boucard, A. A. (2014). Latrophilins updated. *Biomolecular Concepts*, 5(6), 457–478. <https://doi.org/10.1515/bmc-2014-0032>.
- Mitra, I., Tsang, K., Ladd-Acosta, C., Croen, L. A., Aldinger, K. A., Hendren, R. L., et al. (2016). Pleiotropic mechanisms indicated for sex differences in autism. *PLoS Genetics*, 12(11), e1006425. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006425>.
- Mottron, L., Duret, P., Mueller, S., Moore, R. D., d’Arc, F., Jacquemont, B., & Xiong, L. (2015). Sex differences in brain plasticity: A new hypothesis for sex ratio bias in autism. *Molecular Autism*, 6(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s13229-015-0024-1>.





- Naaijen, J., Bralten, J., Poelmans, G., Glennon, J. C., Franke, B., & Buitelaar, J. K. (2017). Glutamatergic and GABAergic gene sets in attention-deficit/hyperactivity disorder: Association to overlapping traits in ADHD and autism. *Translational Psychiatry*, 7(1), e999–e999. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.273>.
- Noroozi, R., Taheri, M., Movafagh, A., Mirfakhraie, R., Solgi, G., Sayad, A., et al. (2016). Glutamate receptor, metabotropic 7 (GRM7) gene variations and susceptibility to autism: A case-control study. *Autism Research*, 9(11), 1161–1168. <https://doi.org/10.1002/aur.1640>.
- Nugent, B. M., Wright, C. L., Shetty, A. C., Hodes, G. E., Lenz, K. M., Mahurkar, A., et al. (2015). Brain feminization requires active repression of masculinization via DNA methylation. *Nature Neuroscience*, 18(5), 690–697. <https://doi.org/10.1038/nn.3988>.
- O’Sullivan, M., Wit, J., De, & Savas, J. (2012). Postsynaptic FLRT proteins are endogenous ligands for the black widow spider venom receptor Latrophilin and regulate excitatory synapse development. *Neuron*, 73(5), 903–910. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.01.018>. Postsynaptic.
- O’Sullivan, M. L., Martini, F., von Daake, S., Comoletti, D., & Ghosh, A. (2014). LPHN3, a presynaptic adhesion-GPCR implicated in ADHD, regulates the strength of neocortical layer 2/3 synaptic input to layer 5. *Neural Development*, 9(7), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-9-7>.
- Orsini, C. A., Setlow, B., DeJesus, M., Galaviz, S., Loesch, K., Ioerger, T., & Wallis, D. (2016). Behavioral and transcriptomic profiling of mice null for *Lphn3*, a gene implicated in ADHD and addiction. *Molecular genetics & genomic medicine*, 4(3), 322–343. <https://doi.org/10.1002/mgg3.207>.
- Park, M. T. M., Raznahan, A., Shaw, P., Gogtay, N., Lerch, J. P., & Chakravarty, M. M. (2018). Neuroanatomical phenotypes in mental illness: identifying convergent and divergent cortical phenotypes across autism, ADHD and schizophrenia. *Journal of Psychiatry & Neuroscience: JPN*, 43(2), 170094.
- Pettersson, E., Anckarsäter, H., Gillberg, C., & Lichtenstein, P. (2013). Different neurodevelopmental symptoms have a common genetic etiology. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 54(12), 1356–1365. <https://doi.org/10.1111/jcpp.12113>.
- Poelmans, G., Pauls, D. L., Buitelaar, J. K., & Franke, B. (2011). Integrated genome-wide association study findings: identification of a neurodevelopmental network for attention deficit hyperactivity disorder. *The American Journal of Psychiatry*, 168(4), 365–377. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2010.10070948>.
- Reuter, I., Knaup, S., Romanos, M., Lesch, K.-P., Drepper, C., & Lillesaar, C. (2016). Developmental exposure to acetaminophen does not induce hyperactivity in zebrafish larvae. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*. <https://doi.org/10.1007/s00702-016-1556-z>.
- Ribasés, M., Ramos-Quiroga, J. A., Sánchez-Mora, C., Bosch, R., Richarte, V., Palomar, G., et al. (2011). Contribution of LPHN3 to the genetic susceptibility to ADHD in adulthood: A replication study. *Genes, Brain and Behavior*, 10(2), 149–157. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2010.00649.x>.
- Rommelse, N. N. J., Geurts, H. M., Franke, B., Buitelaar, J. K., & Hartman, C. A. (2011). A review on cognitive and brain endophenotypes that may be common in autism spectrum disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder and facilitate the search for pleiotropic genes. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35(6), 1363–1396. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.02.015>.
- Ronald, A., & Hoekstra, R. A. (2011). Autism spectrum disorders and autistic traits: A decade of new twin studies. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 156(3), 255–274. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.31159>.
- Ruigrok, A. N. V., Salimi-Khorshidi, G., Lai, M.-C., Baron-Cohen, S., Lombardo, M. V., Tait, R. J., & Suckling, J. (2014). A meta-analysis of sex differences in human brain structure. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 39, 34–50. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.12.004>.
- Schuch, J. B., Muller, D., Endres, R. G., Bosa, C. A., Longo, D., Schuler-Faccini, L., et al. (2014). The role of  $\beta 3$  integrin gene variants in Autism Spectrum Disorders—diagnosis and symptomatology. *Gene*, 553(1), 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.09.058>.
- Sokolova, E., Oerlemans, A. M., Rommelse, N. N., Groot, P., Hartman, C. A., Glennon, J. C., et al. (2017). A causal and mediation analysis of the comorbidity between Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) and Autism Spectrum Disorder (ASD). *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 47(6), 1595–1604. <https://doi.org/10.1007/s10803-017-3083-7>.
- Tau, G. Z., & Peterson, B. S. (2010). Normal development of brain circuits. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 147–168. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.115>.
- Taylor, M. J., Lichtenstein, P., Larsson, H., Anckarsäter, H., Greven, C. U., & Ronald, A. (2016). Is There a female protective effect against attention-deficit/hyperactivity disorder? Evidence from two representative twin samples. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 55(6), 504–512.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2016.04.004>.
- Thapar, A., Martin, J., Mick, E., Arias Vásquez, A., Langley, K., Scherer, S. W., et al. (2015). Psychiatric gene discoveries shape evidence on ADHD’s biology. *Molecular Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.163>.
- Tick, B., Bolton, P., Happé, F., Rutter, M., & Rijdsdijk, F. (2016). Heritability of autism spectrum disorders: a meta-analysis of twin studies. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 57(5), 585–595. <https://doi.org/10.1111/jcpp.12499>.
- Uzunova, G., Hollander, E., & Shepherd, J. (2014). The role of ionotropic glutamate receptors in childhood neurodevelopmental disorders: Autism spectrum disorders and fragile x syndrome. *Current Neuropharmacology*, 12(1), 71–98. <https://doi.org/10.2174/1570159X113116660046>.
- van der Voet, M., Harich, B., Franke, B., & Schenck, a (2015). ADHD-associated dopamine transporter, latrophilin and neurofibromin share a dopamine-related locomotor signature in *Drosophila*. *Molecular Psychiatry*, 10, 1–9. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.55>.
- Wallis, D., Hill, D. S., Mendez, I. A., Abbott, L. C., Finnell, R. H., Wellman, P. J., & Setlow, B. (2012). Initial characterization of mice null for *Lphn3*, a gene implicated in ADHD and addiction. *Brain Research*, 1463, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.04.053>.
- Ward, L. D., & Kellis, M. (2012). HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acids Research*, 40(D1), D930–D934. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr917>.
- Xing, Y., Nakamura, Y., & Rainey, W. E. (2009). G protein-coupled receptor expression in the adult and fetal adrenal glands. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 300(1–2), 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.10.036>.
- Zablotsky, B., Bramlett, M. D., & Blumberg, S. J. (2017). The co-occurrence of autism spectrum disorder in children with ADHD. *Journal of Attention Disorders*. <https://doi.org/10.1177/1087054717713638>.

**Publisher’s Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Capítulo 4

### **Association of common genetic risk for autism spectrum disorder with ADHD core symptom severity and long-term persistence**

Manuscrito em preparação

*Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*



## Capítulo 5

**Rare variants suggest genes potentially affecting ADHD symptoms in a clinical setting and the general population**

Manuscrito em preparação  
*Mol Psychiatry*



# Capítulo 6: Discussão e Considerações Finais



“...Pick up a pen, start writing  
I wanna talk about what I have learned  
The wisdom I have earned ...”

Lin-Manuel Miranda  
In: Hamilton – One last time

## Discussão e Considerações Finais

Os Capítulos anteriores (de 3 a 5) apresentam as discussões específicas acerca dos resultados apresentados em cada manuscrito incluído nesta Tese. Neste Capítulo abordamos aspectos mais gerais e contextualizados da presente Tese, com a finalidade de situar nossos resultados no estado-da-arte da genética dos Transtornos do Neurodesenvolvimento, oferecendo informações relevantes para avançar nossa compreensão da etiologia desses transtornos.

A execução desta Tese se deu durante um período de grandes avanços no campo de estudo da contribuição genética para os transtornos psiquiátricos, principalmente no que tange ao desenvolvimento de análises genômicas em larga escala, utilizando dados de variantes comuns e também raras. Dessa forma, a construção da mesma seguiu a evolução do conhecimento acerca das bases biológicas dos transtornos e da implementação crescente de abordagens metodológicas complementares. Esse constante processo de aprimoramento do conhecimento é visível ao longo dos Capítulos 3 a 5, onde utilizamos um conjunto amplo dessas abordagens (estudos de gene-candidato, estudos de escores de risco poligênico, estudos de sequenciamento de variantes de raras) com o objetivo de identificar potenciais genes, rotas biológicas ou fatores pleiotrópicos que influenciam na apresentação e desenvolvimento do TDAH e do TEA.

O tema central desta Tese, do qual todos os objetivos foram derivados, é o reconhecimento de que os Transtornos do Neurodesenvolvimento apresentam uma grande heterogeneidade clínica em vários níveis (sintomas, gravidade, comorbidades) e

que esta característica cria inúmeros desafios para a investigação científica relacionada aos transtornos. Nesse contexto, a presente Tese buscou auxiliar na construção de um entendimento da arquitetura genética dos Transtornos do Neurodesenvolvimento considerando que o estudo de subgrupos mais homogêneos e de endofenótipos podem ser de grande valia aos esforços que buscam detectar os componentes genéticos envolvidos na etiologia e na manifestação clínica associada ao TDAH e o TEA.

A pesquisa apresentada ao longo desta Tese contribuiu com evidências para a literatura crescente acerca dos mecanismos moleculares subjacentes a dois transtornos, o TDAH e o TEA, defendendo que abordagens complementares (tanto na área molecular, quanto na área fenotípica) propiciam um maior entendimento da etiologia dos transtornos.

Os primeiros resultados desta Tese (Capítulo 3) derivam da clássica abordagem de gene-candidato, demonstrando a associação de polimorfismos no gene *ADGRL3* com o TDAH e também com o TEA. A escolha do *ADGRL3* seguiu trabalhos prévios do grupo (Kappel et al. 2017), além de uma expressiva presença na literatura das bases genéticas do TDAH (Arcos-Burgos et al. 2010; Jain et al. 2012; Choudhry et al. 2012; Bruxel et al. 2015; Martinez et al. 2016; Gomez-Sanchez et al. 2016; Acosta et al. 2016; McNeill et al. 2020). Considerando as evidências acerca da relevância molecular do gene em múltiplas frentes (genética, fisiopatologia, fármaco, neuroquímica, sintomatologia) nossa abordagem foi voltada para a elucidação do papel do gene em mecanismos compartilhados dos Transtornos do Neurodesenvolvimento. Nosso estudo foi o primeiro a avaliar que *ADGRL3* possa ser um gene com relevante importância a outros Transtornos

do Neurodesenvolvimento, além do TDAH. Porém, a existência de efeitos pleiotrópicos para o gene já foi demonstrada previamente, especialmente em relação aos transtornos por uso de substâncias (Jain et al. 2007; Arcos-Burgos et al. 2012; Arcos-Burgos et al. 2019).

Nossos resultados sugerem que o gene *ADGRL3* está implicado na arquitetura genética do TDAH e do TEA. Ao longo do Capítulo 3, discutimos possíveis rotas biológicas relacionadas à função deste gene e processos de neurodesenvolvimento, com ênfase na interação entre *ADGRL3-FLRT3* e seu papel crucial no desenvolvimento e funcionamento das sinapses glutamatérgicas (O'Sullivan et al. 2012; 2014). Outro conjunto de evidências indireto, relacionado ao padrão de interação entre a *ADGRL3* e outras proteínas pode também nos ajudar a entender a influência desse gene tanto no TDAH quanto no TEA. Foi sugerido que *ADGRL3* também interage com proteínas da família *SHANK* (Kreienkamp et al. 2000), proteínas que conectam receptores de neurotransmissores, canais iônicos e outras proteínas de membrana às vias de sinalização da actina citoesquelética e acoplada da proteína G. Notavelmente, *SHANK3* atua na formação de sinapses e maturação das espinhas dendríticas (Durand et al. 2012) e é um conhecido gene de risco para o TEA, especialmente pelo excesso de variantes raras identificadas e associadas com o transtorno (Uchino and Waga 2013; Stessman et al. 2017; Tammimies 2019; Satterstrom et al. 2020).

Os dados do Capítulo 3, os quais foram também incluídos em uma meta-análise (Bruxel et al. 2020), e os importantíssimos achados do consórcio IMpACT (Rovira et al. 2020) incitam uma discussão sobre as possíveis diferenças entre o TDAH na infância e na



fase adulta. Há muito algumas questões permeiam o estudo da genética do TDAH, se: 1) existem diferenças genéticas entre o TDAH em crianças e em adultos? 2) fatores genéticos podem diferir entre os indivíduos que persistem com o diagnóstico e aqueles que apresentam remissão dos sintomas com a idade? Os achados apresentados em Rovira et al. sugerem que existe uma base genética comum entre o TDAH na infância e o TDAH persistente em adultos, com alta correlação genética entre as duas formas ( $r_G = 0.81$ ). Por outro lado, o mesmo estudo identificou que essa correlação, apesar de alta, é diferente de 1, sugerindo que existe uma parcela, ainda que pequena, de heterogeneidade genética entre o TDAH em crianças e adultos. Os achados apresentados no Capítulo 3, combinados à meta-análise apresentada no Apêndice (Bruxel et al. 2020), nos possibilitam hipotetizar que *ADGRL3* faça parte dessa parcela de fatores de risco genéticos que são diferentes entre o TDAH em crianças e adultos, ou persistente versus remitente.

Os transtornos psiquiátricos seguem classificações cuidadosamente elaboradas, que por sua vez se baseiam em vários perfis e apresentações de sintomas (APA 2013), porém é uma questão em aberto se as atuais classificações refletem uma estrutura semelhante no nível genético. Recentemente, alguns estudos têm sugerido a validade dessas classificações ao mostrar a sobreposição de fatores genéticos e mecanismos neurobiológicos entre transtornos distintos, apoiando, por exemplo, o agrupamento do TDAH dentro dos Transtornos do Neurodesenvolvimento (APA 2013; Brainstorm Consortium 2018; Lee et al. 2019).

Contribuindo para essa noção, é bem aceito que as características centrais de ambos TDAH e TEA - em particular desatenção e déficits sociais - se sobrepõem (Simonoff et al. 2008; Ronald et al. 2008; Kaat et al. 2013; Lai et al. 2014; Lecavalier et al. 2019; Ghirardi et al. 2019), e que parcialmente, essa sobreposição pode estar refletindo uma genética compartilhada subjacente (Taylor et al. 2015; Pinto et al. 2016; Ghirardi et al. 2019). No Capítulo 4, abordamos a influência pleiotrópica entre a variabilidade genética associada ao TEA na manifestação clínica do TDAH. Nossa abordagem utilizou escores de risco poligênico derivados do mais recente GWAS de TEA (Grove et al. 2019), para investigar se existem fatores genéticos compartilhados entre os dois transtornos. Observamos que escores de risco representando fatores genéticos comuns associados ao TEA, estão associados com sintomas de TDAH e com a persistência do transtorno ao longo da vida adulta. Esses resultados podem estar refletindo que uma base genética comum aos Transtornos do Neurodesenvolvimento está relacionada com padrões de persistência e prejuízo decorrentes do TDAH ao longo da vida dos indivíduos. Assim como no Capítulo 3, é possível que esses achados contribuam para o entendimento dos fatores genéticos diferenciais entre as trajetórias de persistência do TDAH persistente e o curso remitente (Rovira et al. 2020).

A identificação de fatores genéticos específicos relacionados ao desenvolvimento dos transtornos psiquiátricos permanece uma questão em aberto e continua sendo um grande desafio na área. Até o presente momento, apesar dos esforços em angariar tamanhos amostrais cada vez maiores, o número de associações significativas ao nível genômico é ainda modesto tanto para o TDAH quanto para o TEA (Demontis et al. 2019; Grove et al. 2019). Inicialmente se tinha grande expectativa que os diversos GWAS

realizados na área, com tamanho amostral sempre crescente, seriam capazes de relevar grande parte dos fatores genéticos subjacentes. Infelizmente a proporção da herdabilidade explicada por estes ainda está muito aquém da herdabilidade estimada. No entanto, mais recentemente o uso de sequenciamento de genoma na busca pela herdabilidade perdida tem gerado boas perspectivas nessa área. Para a altura, por exemplo, estima-se que quando variantes comuns e também as variantes raras são analisadas em conjunto, aproximadamente toda a herdabilidade do fenótipo é explicada (Wainschein et al. 2019).

Similarmente, os efeitos decorrentes do envolvimento de variantes genéticas raras e de baixa frequência foram propostos para explicar parte da herdabilidade ainda desconhecida do TDAH (Demontis et al. 2016; Satterstrom et al. 2019). Para isso, são utilizadas técnicas de sequenciamento total do genoma ou de exoma (que captura éxons e algumas regiões não codificantes, como os limites íntron-éxon e regiões não traduzidas). No contexto dos Transtornos do Neurodesenvolvimento, esses estudos foram amplamente conduzidos no TEA (Satterstrom et al. 2020), porém o conhecimento acerca do papel de variantes raras na suscetibilidade ao TDAH está em seus estágios iniciais (Demontis et al. 2016; Zayats et al. 2016; Corominas et al. 2018; Al-Mubarak et al. 2020).

Seguindo esta perspectiva, o Capítulo 5 da presente Tese acrescenta dados de um tipo de variação genética de alto impacto, porém pouco estudada, e que pode estar envolvido na etiologia do TDAH. Nossos achados apontam que variantes raras localizadas em genes com funções e expressão relevantes no sistema nervoso central estejam implicados na manifestação clínica do TDAH, em especial o domínio de desatenção. Nesse

estudo nós também demonstramos que as variantes raras identificadas seguem um padrão de enriquecimento em algumas rotas biológicas, notadamente aquelas relacionadas ao citoesqueleto e função microtubular. Mais estudos serão necessários para reiterar a participação desses sistemas e aumentar a compreensão dos mecanismos moleculares.

Nossos esforços para identificar variantes raras associadas com características fenotípicas dos Transtornos do Neurodesenvolvimento foram focados no TDAH. No entanto, é importantíssimo ressaltar que nossos achados se somam a resultados de esforços similares no TEA (Satterstrom et al. 2019; Satterstrom et al. 2020). A coleção de genes implicados parece ser enriquecida para certas funções biológicas incluindo organização do citoesqueleto, sugerindo que variantes raras afetam mecanismos e rotas biológicas similares no TDAH e TEA. Esses processos biológicos são centrais para a função cerebral, portanto, não é surpreendente descobrir que seu envolvimento na etiologia nos Transtornos do Neurodesenvolvimento tem sido descrito repetidamente na literatura (Poelmans et al. 2011; Middeldorp 2016; Satterstrom et al. 2019; Satterstrom et al. 2020; Al-Mubarak et al. 2020).

Os resultados dos Capítulos 4 e 5 dessa Tese foram obtidos através de esforços em larga escala para obtenção de dados genômicos de variantes comuns e raras, apoiando a continuação das varreduras genômicas e dos sequenciamentos de genoma na investigação da arquitetura genética dos Transtornos do Neurodesenvolvimento. Na última década, os estudos do tipo GWAS foram cruciais na descoberta de fatores genéticos associados aos mais diversos fenótipos psiquiátricos (Ripke et al. 2014; Wray et

al. 2018; Demontis et al. 2019; Grove et al. 2019). Apesar das dificuldades iniciais, com o passar do tempo, os consórcios responsáveis pela maioria dos estudos de varredura foram capazes de alcançar os grandes tamanhos amostrais necessários para identificar as associações genéticas estatisticamente significativas neste tipo de estudo. É inegável a contribuição dos GWAS para o atual conhecimento da genética psiquiátrica, e é inegável também que tal feito foi baseado na escolha de uma grande quantidade de dados e não necessariamente em um detalhamento fenotípico intenso. Ao passo que novas variantes genéticas e genes estavam sendo identificados, ficou claro que a validade dessas associações dependia também da qualidade do fenótipo analisado (Cai et al. 2020). A perspectiva atual tem mostrado que é cada vez mais importante aliar as duas frentes. Assim, apesar de que a estratégia de fenótipo mínimo tenha resultado em rapidez no angariamento das amostras, a caracterização fenotípica detalhada traz mais confiança nos achados, além de permitir a realização de análises mais profundas. Essa perspectiva é de suma importância e foi abordada, em diferentes níveis, em todos os Capítulos desta Tese.

A análise dos fatores genéticos envolvidos em fenótipos mais detalhados tem o potencial de aumentar o poder de detectar variantes associadas e fornecer informações importantes sobre fenótipos geneticamente semelhantes e sobre mecanismos biológicos subjacentes (Faraone et al. 2014; Hall & Smoller, 2010; Zhang et al. 2020). Nesta Tese, buscamos avaliar a influência de fatores genéticos na heterogeneidade fenotípica dos Transtornos do Neurodesenvolvimento, especialmente do TDAH, analisando os perfis de desenvolvimento do transtorno (Capítulo 3), sintomas (Capítulos 4 e 5), e trajetória ao longo da vida (Capítulo 4). Além disso, o conjunto de evidências relatados nesta Tese

apresenta resultados convergentes em algumas frentes. Nos Capítulos 3 e 4, nossos achados contribuem à literatura que sugere a existência de fatores genéticos compartilhados entre o TDAH e o TEA. Nos Capítulos 4 e 5, observamos que as associações de genes enriquecidos em variantes raras e de escores poligênicos de neurodesenvolvimento são mais expressivas no domínio de desatenção. Por último, nos Capítulos 3 (indiretamente) e 5 (diretamente), observamos que genes envolvidos nas rotas biológicas relacionados ao citoesqueleto parecem ser relevantes. Dentro desse panorama, os estudos apresentados nesta Tese mostram que investigações genéticas em fenótipos mais refinados e sobreposição genética entre características relacionadas podem fornecer informações valiosas, aumentando assim nossa compreensão das características psiquiátricas.

Concluindo, nesta Tese, fornecemos evidências de fatores genéticos que afetam o desenvolvimento dos Transtornos do Neurodesenvolvimento, além de fatores que influenciam os sintomas do TDAH usando diferentes abordagens moleculares. Os novos genes e rotas biológicas apresentados nesta Tese podem indicar fatores de susceptibilidade aos Transtornos do Neurodesenvolvimento e suas características clínicas, contribuindo para o entendimento dos processos fisiopatológicos relacionados ao desenvolvimento destes transtornos. O conjunto de resultados apresentados reforça a perspectiva de que as estratégias das futuras investigações devem integrar os estudos de varredura genômica de variantes comuns e raras, além de priorizar um detalhamento fenotípico mais acurado (Marjoram et al. 2014; Visscher et al. 2017).

O constante aprimoramento de técnicas e o crescente número de achados relevantes à arquitetura genética dos transtornos psiquiátricos demonstra o quanto o campo vem se desenvolvendo rapidamente. Da mesma forma, o entendimento necessário da genética, do cérebro e do comportamento humano está intimamente relacionado a um trabalho constante, e principalmente cooperativo. Esta Tese buscou aliar todos esses componentes, facilitando a implementação de diversas análises e novas cooperações internacionais. Esperamos que o trabalho aqui desenvolvido sirva de base para muitos outros, continuando nossa missão de entender os mecanismos biológicos envolvidos nos Transtornos do Neurodesenvolvimento e objetivando futuras melhorias no reconhecimento, tratamento e qualidade de vida dos indivíduos afetados por estas condições.

# Referências Bibliográficas





Acosta MT, Swanson J, Stehli A, Molina BSG, Martinez AF, Arcos-Burgos M and Muenke M (2016) ADGRL3 (LPHN3) variants are associated with a refined phenotype of ADHD in the MTA study. *Mol Genet Genomic Med* 4:540–547. doi: 10.1002/mgg3.230

Al-Mubarak BR, Omar A, Baz B, Al-Abdulaziz B, Magrashi AI, Al-Yemni E, Jabaan A, Monies D, Abouelhoda M, Abebe D et al. (2020) Whole exome sequencing in ADHD trios from single and multi-incident families implicates new candidate genes and highlights polygenic transmission. *Eur J Hum Genet* 28:1098–1110. doi: 10.1038/s41431-020-0619-7

APA (2013) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5®)*. American Psychiatric Pub

Arcos-Burgos M, Castellanos FX, Pineda D, Lopera F, Palacio JD, Palacio LG, Rapoport JL, Berg K, Bailey-Wilson JE and Muenke M (2004) Attention-deficit/hyperactivity disorder in a population isolate: linkage to loci at 4q13.2, 5q33.3, 11q22, and 17p11. *Am J Hum Genet* 75:998–1014. doi: 10.1086/426154

Arcos-Burgos M, Jain M, Acosta MT, Shively S, Stanescu H, Wallis D, Domené S, Vélez JI, Karkera JD, Balog J et al. (2010) A common variant of the latrophilin 3 gene, LPHN3, confers susceptibility to ADHD and predicts effectiveness of stimulant medication. *Mol Psychiatry* 15:1053–1066. doi: 10.1038/mp.2010.6

Arcos-Burgos M, Vélez JI, Solomon BD and Muenke M (2012) A common genetic network underlies substance use disorders and disruptive or externalizing disorders. *Hum Genet* 131:917–929. doi: 10.1007/s00439-012-1164-4

Arcos-Burgos M, Vélez JI, Martinez AF, Ribasés M, Ramos-Quiroga JA, Sánchez-Mora C, Richarte V, Roncero C, Cormand B, Fernández-Castillo N et al. (2019) ADGRL3 (LPHN3) variants predict substance use disorder. *Transl Psychiatry* 9:42. doi: 10.1038/s41398-019-0396-7

Asperger H (1944) Die „Autistischen Psychopathen“ im Kindesalter. *Arch Psychiatr Nervenkr* 117:76–136. doi: 10.1007/BF01837709

Babb de Villiers C, Kroese M and Moorthie S (2020) Understanding polygenic models, their development and the potential application of polygenic scores in healthcare. *J Med Genet* 57:725 LP – 732. doi: 10.1136/jmedgenet-2019-106763

Baio J, Wiggins L, Christensen DL, Maenner MJ, Daniels J, Warren Z, Kurzius-Spencer M, Zahorodny W, Robinson Rosenberg C, White T et al. (2018) Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveill Summ* 67:1–23. doi: 10.15585/mmwr.ss6706a1

Balicza P, Varga NÁ, Bolgár B, Pentelényi K, Bencsik R, Gál A, Gézsi A, Prekop C, Molnár V and Molnár MJ (2019) Comprehensive analysis of rare variants of 101 autism-linked genes in a Hungarian cohort of autism spectrum disorder patients. *Front Genet*. doi:

10.3389/fgene.2019.00434

Banerjee T Das, Middleton F and Faraone S V (2007) Environmental risk factors for attention-deficit hyperactivity disorder. *Acta Paediatr* 96:1269–74. doi: 10.1111/j.1651-2227.2007.00430.x

Barkley RA and Peters H (2012) The earliest reference to ADHD in the medical literature? Melchior Adam Weikard's description in 1775 of "attention deficit"; (Mangel der Aufmerksamkeit, *Attentio Volubilis*). *J Atten Disord* 16:623–30. doi: 10.1177/1087054711432309

Biederman J, Faraone S V, Spencer TJ, Mick E, Monuteaux MC 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* 67:524–40.

Bonvicini C, Faraone S V and Scassellati C (2016) Attention-deficit hyperactivity disorder in adults: A systematic review and meta-analysis of genetic, pharmacogenetic and biochemical studies. *Mol Psychiatry* 2016. doi: 10.1038/mp.2016.74

Bowden G (2014) The merit of sociological accounts of disorder: The Attention-Deficit Hyperactivity Disorder case. *Heal An Interdiscip J Soc Study Heal Illn Med* 18:422–438. doi: 10.1177/1363459313507585

Brainstorm Consortium, Anttila V, Bulik-Sullivan B, Finucane HK, Walters RK, Bras J, Duncan L, Escott-Price V, Falcone GJ, Gormley P et al. (2018) Analysis of shared heritability in common disorders of the brain. *Science*. doi: 10.1126/science.aap8757

Brikell I, Kuja-Halkola R and Larsson H (2015) Heritability of attention-deficit hyperactivity disorder in adults. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 406–413. doi: 10.1002/ajmg.b.32335

Bruxel EM, Moreira-Maia CR, Akutagava-Martins GC, Quinn TP, Klein M, Franke B, Ribasés M, Rovira P, Sánchez-Mora C, Kappel DB et al. (2020) Meta-analysis and systematic review of ADGRL3 (LPHN3) polymorphisms in ADHD susceptibility. *Mol Psychiatry*. doi: 10.1038/s41380-020-0673-0

Bruxel EM, Salatino-Oliveira A, Akutagava-Martins GC, Tovo-Rodrigues L, Genro JP, Zeni CP, Polanczyk G V., Chazan R, Schmitz M, Arcos-Burgos M et al. (2015) LPHN3 and attention-deficit/hyperactivity disorder: A susceptibility and pharmacogenetic study. *Genes, Brain Behav* 14:419–427. doi: 10.1111/gbb.12224

Bulik-Sullivan B, Finucane HK, Anttila V, Gusev A, Day FR, Loh PR, Duncan L, Perry JRB, Patterson N, Robinson EB et al. (2015) An atlas of genetic correlations across human diseases and traits. *Nat Genet* 47:1236–1241. doi: 10.1038/ng.3406

Cai N, Revez JA, Adams MJ, Andlauer TFM, Breen G, Byrne EM, Clarke T-K, Forstner AJ, Grabe HJ, Hamilton SP et al. (2020) Minimal phenotyping yields genome-wide association

signals of low specificity for major depression. *Nat Genet* 52:437–447. doi: 10.1038/s41588-020-0594-5

Cantwell DP (1972) Psychiatric Illness in the Families of Hyperactive Children. *Arch Gen Psychiatry* 27:414. doi: 10.1001/archpsyc.1972.01750270114018

Carlsson T, Molander F, Taylor MJ, Jonsson U and Bölte S (2020) Early environmental risk factors for neurodevelopmental disorders – a systematic review of twin and sibling studies. *Dev Psychopathol* 1–48. doi: 10.1017/S0954579420000620

Chang Z, Lichtenstein P, Asherson PJ and Larsson H (2013) Developmental twin study of attention problems: high heritabilities throughout development. *JAMA Psychiatry* 70:311. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2013.287

Chaste P, Roeder K and Devlin B (2017) The Yin and Yang of Autism Genetics: How Rare De Novo and Common Variations Affect Liability. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 18:167–187. doi: 10.1146/annurev-genom-083115-022647

Chen Q, Hartman CA, Haavik J, Harro J, Klungsøyr K, Hegvik T-A, Wanders R, Ottosen C, Dalsgaard S, Faraone S V. et al. (2018) Common psychiatric and metabolic comorbidity of adult attention-deficit/hyperactivity disorder: A population-based cross-sectional study. *PLoS One* 13:e0204516. doi: 10.1371/journal.pone.0204516

Choi SW, Mak TS-H and O'Reilly PF (2020) Tutorial: a guide to performing polygenic risk score analyses. *Nat Protoc* 15:2759–2772. doi: 10.1038/s41596-020-0353-1

Choudhry Z, Sengupta SM, Grizenko N, Fortier ME, Thakur GA, Bellingham J and Joober R (2012) LPHN3 and attention-deficit/hyperactivity disorder: Interaction with maternal stress during pregnancy. *J Child Psychol Psychiatry Allied Discip* 53:892–902. doi: 10.1111/j.1469-7610.2012.02551.x

Corominas J, Klein M, Zayats T, Rivero O, Ziegler GC, Pauper M, Neveling K, Poelmans G, Jansch C, Svirin E et al. (2018) Identification of ADHD risk genes in extended pedigrees by combining linkage analysis and whole-exome sequencing. *Mol Psychiatry*. doi: 10.1038/s41380-018-0210-6

Demontis D, Lescai F, Børglum A, Glerup S, Østergaard SD, Mors O, Li Q, Liang J, Jiang H, Li Y et al. (2016) Whole-Exome Sequencing Reveals Increased Burden of Rare Functional and Disruptive Variants in Candidate Risk Genes in Individuals With Persistent Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 55:521–523. doi: 10.1016/j.jaac.2016.03.009

Demontis D, Walters RK, Martin J, Mattheisen M, Als TD, Agerbo E, Baldursson G, Belliveau R, Bybjerg-Grauholm J, Bækvad-Hansen M et al. (2019) Discovery of the first genome-wide significant risk loci for attention deficit/hyperactivity disorder. *Nat Genet* 51:63–75. doi: 10.1038/s41588-018-0269-7

Durand CM, Perroy J, Loll F, Perrais D, Fagni L, Bourgeron T, Montcouquiol M and Sans N (2012) SHANK3 mutations identified in autism lead to modification of dendritic spine morphology via an actin-dependent mechanism. *Mol Psychiatry* 17:71–84. doi: 10.1038/mp.2011.57

E Anker BBTH (2018) Comorbid psychiatric disorders in a clinical sample of adults with ADHD, and associations with education, work and social characteristics: a cross-sectional study. *BMJ Open* 8:e019700.

Elsabbagh M, Divan G, Koh YJ, Kim YS, Kauchali S, Marcín C, Montiel-Nava C, Patel V, Paula CS, Wang C et al. (2012) Global Prevalence of Autism and Other Pervasive Developmental Disorders. *Autism Res* 5:160–179. doi: 10.1002/aur.239

Euesden J, Lewis CM and O'Reilly PF (2015) PRSice: Polygenic Risk Score software. *Bioinformatics* 31:1466–1468. doi: 10.1093/bioinformatics/btu848

Faraone S V., Asherson P, Banaschewski T, Biederman J, Buitelaar JK, Ramos-Quiroga JA, Rohde LA, Sonuga-Barke EJS, Tannock R and Franke B (2015) Attention-deficit/hyperactivity disorder. *Nat Rev Dis Prim* 1:15020. doi: 10.1038/nrdp.2015.20

Faraone S V., Bonvicini C and Scassellati C (2014) Biomarkers in the Diagnosis of ADHD – Promising Directions. *Curr Psychiatry Rep* 16:497. doi: 10.1007/s11920-014-0497-1

Faraone S V. and Larsson H (2019) Genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 24:562–575. doi: 10.1038/s41380-018-0070-0

Faraone S V, Biederman J and Mick E (2006) The age-dependent decline of Attention Deficit Hyperactivity Disorder: a meta-analysis of follow-up studies. *Psychol Med* 36:159–165. doi: 10.1017/s003329170500471x

Faraone S V and Mick E (2010) Molecular genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr Clin North Am* 33:159–180. doi: 10.1016/j.psc.2009.12.004S0193-953X(09)00106-3 [pii]

Fayyad J, Sampson NA, Hwang I, Adamowski T, Aguilar-Gaxiola S, Al-Hamzawi A, Andrade LHS, Borges G, de Girolamo G, Florescu S et al. (2017) The descriptive epidemiology of DSM-IV Adult ADHD in the World Health Organization World Mental Health Surveys. *ADHD Atten Deficit Hyperact Disord* 9:47–65. doi: 10.1007/s12402-016-0208-3

Fernandez BA and Scherer SW (2017) Syndromic autism spectrum disorders: moving from a clinically defined to a molecularly defined approach. *Dialogues Clin Neurosci* 19:353–371.

Franke B, Faraone S V, Asherson P, Buitelaar J, Bau CHD, Ramos-Quiroga JA, Mick E, Grevet EH, Johansson S, Haavik J et al. (2012) The genetics of attention deficit/hyperactivity disorder in adults, a review. *Mol Psychiatry* 17:960–87. doi: 10.1038/mp.2011.138

Franke B, Michelini G, Asherson P, Banaschewski T, Billow A, Buitelaar JK, Cormand B, Faraone S V., Ginsberg Y, Haavik J et al. (2018) Live fast, die young? A review on the developmental trajectories of ADHD across the lifespan. *Eur Neuropsychopharmacol* 28:1059–1088. doi: 10.1016/j.euroneuro.2018.08.001

Ghirardi L, Brikell I, Kuja-Halkola R, Freitag CM, Franke B, Asherson P, Lichtenstein P and Larsson H (2018) The familial co-aggregation of ASD and ADHD: A register-based cohort study. *Mol Psychiatry* 23:257–262. doi: 10.1038/mp.2017.17

Ghirardi L, Pettersson E, Taylor MJ, Freitag CM, Franke B, Asherson P, Larsson H and Kuja-Halkola R (2019) Genetic and environmental contribution to the overlap between ADHD and ASD trait dimensions in young adults: A twin study. *Psychol Med* 49:1713–1721. doi: 10.1017/S003329171800243X

Gizer IR, Ficks C and Waldman ID (2009) Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet* 126:51–90. doi: 10.1007/s00439-009-0694-x

Gnanavel S, Sharma P, Kaushal P and Hussain S (2019) Attention deficit hyperactivity disorder and comorbidity: A review of literature. *World J Clin cases* 7:2420–2426. doi: 10.12998/wjcc.v7.i17.2420

Gomez-Sanchez CI, Riveiro-Alvarez R, Soto-Insuga V, Rodrigo M, Tirado-Requero P, Mahillo-Fernandez I, Abad-Santos F, Carballo JJ, Dal-Ré R and Ayuso C (2016) Attention deficit hyperactivity disorder: Genetic association study in a cohort of Spanish children. *Behav Brain Funct* 12:2. doi: 10.1186/s12993-015-0084-6

Gotham K, Brunwasser SM and Lord C (2015) Depressive and anxiety symptom trajectories from school age through young adulthood in samples with autism spectrum disorder and developmental delay. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 54:369–76.e3. doi: 10.1016/j.jaac.2015.02.005

Grove J, Ripke S, Als TD, Mattheisen M, Walters RK, Won H, Pallesen J, Agerbo E, Andreassen OA, Anney R et al. (2019) Identification of common genetic risk variants for autism spectrum disorder. *Nat Genet* 51:431–444. doi: 10.1038/s41588-019-0344-8

H Larsson ZCBDPL (2014) The heritability of clinically diagnosed attention deficit hyperactivity disorder across the lifespan. *Psychol Med* 44:2223–9.

Hall M-H (2010) A New Role for Endophenotypes in the GWAS Era. *Harv Rev Psychiatry* 18:67–74. doi: 10.3109/10673220903523532

Harrington AJ, Raissi A, Rajkovich K, Berto S, Kumar J, Molinaro G, Raduazzo J, Guo Y, Loerwald K, Konopka G et al. (2016) MEF2C regulates cortical inhibitory and excitatory synapses and behaviors relevant to neurodevelopmental disorders. *Elife*. doi: 10.7554/eLife.20059

Harris J (2018) Leo Kanner and autism. 75-year perspective. *Int Rev Psychiatry* 30:3–17.

doi: 10.1080/09540261.2018.1455646

Hawi Z, Cummins TDR, Tong J, Johnson B, Lau R, Samarrai W and Bellgrove MA (2015) The molecular genetic architecture of attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 20:289–97. doi: 10.1038/mp.2014.183

Hill AP, Zuckerman KE, Hagen AD, Kriz DJ, Duvall SW, van Santen J, Nigg J, Fair D and Fombonne E (2014) Aggressive Behavior Problems in Children with Autism Spectrum Disorders: Prevalence and Correlates in a Large Clinical Sample. *Res Autism Spectr Disord* 8:1121–1133. doi: 10.1016/j.rasd.2014.05.006

Höglund J, Rafati N, Rask-Andersen M, Enroth S, Karlsson T, Ek WE and Johansson Å (2019) Improved power and precision with whole genome sequencing data in genome-wide association studies of inflammatory biomarkers. *Sci Rep* 9:16844. doi: 10.1038/s41598-019-53111-7

Hoogman M, Bralten J, Hibar DP, Mennes M, Zwiers MP, Schweren LSJ, van Hulzen KJE, Medland SE, Shumskaya E, Jahanshad N et al. (2017) Subcortical brain volume differences in participants with attention deficit hyperactivity disorder in children and adults: a cross-sectional mega-analysis. *The Lancet Psychiatry* 4:310–319. doi: 10.1016/S2215-0366(17)30049-4

Hoogman M, Muetzel R, Guimaraes JP, Shumskaya E, Mennes M, Zwiers MP, Jahanshad N, Sudre G, Wolfers T, Earl EA et al. (2019) Brain imaging of the cortex in ADHD: A coordinated analysis of large-scale clinical and population-based samples. *Am J Psychiatry* 176:531–542. doi: 10.1176/appi.ajp.2019.18091033

Horwitz T, Lam K, Chen Y, Xia Y and Liu C (2018) A decade in psychiatric GWAS research. *Mol Psychiatry* 1–12. doi: 10.1038/s41380-018-0055-z

Howard DM, Adams MJ, Shirali M, Clarke T-K, Marioni RE, Davies G, Coleman JRI, Alloza C, Shen X, Barbu MC et al. (2018) Genome-wide association study of depression phenotypes in UK Biobank identifies variants in excitatory synaptic pathways. *Nat Commun* 9:1470. doi: 10.1038/s41467-018-03819-3

Hwang IW, Lim MH, Kwon HJ and Jin HJ (2015) Association of LPHN3 rs6551665 A/G polymorphism with attention deficit and hyperactivity disorder in Korean children. *Gene* 566:68–73. doi: 10.1016/j.gene.2015.04.033

Jain M, Palacio LG, Castellanos FX, Palacio JD, Pineda D, Restrepo MI, Muñoz JF, Lopera F, Wallis D, Berg K et al. (2007) Attention-deficit/hyperactivity disorder and comorbid disruptive behavior disorders: evidence of pleiotropy and new susceptibility loci. *Biol Psychiatry* 61:1329–39. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.06.026

Jain M, Vélez JI, Acosta MT, Palacio LG, Balog J, Roessler E, Pineda D, Londño AC, Palacio JD, Arbelaez A et al. (2012) A cooperative interaction between LPHN3 and 11q doubles the risk for ADHD. *Mol Psychiatry* 17:741–747. doi: 10.1038/mp.2011.59

- Jensen CM and Steinhausen HC (2015) Comorbid mental disorders in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder in a large nationwide study. *ADHD Atten Deficit Hyperact Disord* 7:27–38. doi: 10.1007/s12402-014-0142-1
- Jorgensen TJ, Ruczinski I, Kessing B, Smith MW, Shugart YY and Alberg AJ (2009) Hypothesis-driven candidate gene association studies: practical design and analytical considerations. *Am J Epidemiol* 170:986–93. doi: 10.1093/aje/kwp242
- Kaat AJ, Gadow KD and Lecavalier L (2013) Psychiatric symptom impairment in children with autism spectrum disorders. *J Abnorm Child Psychol* 41:959–969. doi: 10.1007/s10802-013-9739-7
- Kanner L (1943) Autistic disturbances of affective contact. *Nerv Child* 2:217–250.
- Kappel DB, Schuch JB, Rovaris DL, da Silva BS, Cupertino RB, Winkler C, Teche SP, Vitola ES, Karam RG, Rohde LA et al. (2017) Further replication of the synergistic interaction between LPHN3 and the NTAD gene cluster on ADHD and its clinical course throughout adulthood. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.06.011
- Kessler RC, Petukhova M and Zaslavsky AM (2011) The role of latent internalizing and externalizing predispositions in accounting for the development of comorbidity among common mental disorders. *Curr Opin Psychiatry* 24:307.
- Kreienkamp H-J, Zitzer H, Gundelfinger ED, Richter D and Böckers TM (2000) The Calcium-independent Receptor for  $\alpha$ -Latrotoxin from Human and Rodent Brains Interacts with Members of the ProSAP/SSTRIP/Shank Family of Multidomain Proteins. *J Biol Chem* 275:32387–32390. doi: 10.1074/jbc.C000490200
- Labbe A, Liu A, Atherton J, Gizenko N, Fortier M, Sengupta SM and Ridha J (2012) Refining psychiatric phenotypes for response to treatment: Contribution of LPHN3 in ADHD. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 159 B:776–785. doi: 10.1002/ajmg.b.32083
- Lai M-C, Lombardo M V and Baron-Cohen S (2014) Autism. *Lancet* 383:896–910. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61539-1
- Lai MC, Kassee C, Besney R, Bonato S, Hull L, Mandy W, Szatmari P and Ameis SH (2019) Prevalence of co-occurring mental health diagnoses in the autism population: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Psychiatry* 6:819–829. doi: 10.1016/S2215-0366(19)30289-5
- Lange M, Norton W, Coolen M, Chaminade M, Merker S, Proft F, Schmitt A, Vernier P, Lesch K-P and Bally-Cuif L (2012) The ADHD-susceptibility gene *lphn3.1* modulates dopaminergic neuron formation and locomotor activity during zebrafish development. *Mol Psychiatry* 17:946–954. doi: 10.1038/mp.2012.29

Larsson H, Anckarsater H, Råstam M, Chang Z and Lichtenstein P (2012) Childhood attention-deficit hyperactivity disorder as an extreme of a continuous trait: a quantitative genetic study of 8,500 twin pairs. *J Child Psychol Psychiatry* 53:73–80. doi: 10.1111/j.1469-7610.2011.02467.x

Larsson H, Asherson P, Chang Z, Ljung T, Friedrichs B, Larsson J-O and Lichtenstein P (2013) Genetic and environmental influences on adult attention deficit hyperactivity disorder symptoms: a large Swedish population-based study of twins. *Psychol Med* 43:197–207. doi: 10.1017/S0033291712001067

Lecavalier L, McCracken CE, Aman MG, McDougle CJ, McCracken JT, Tierney E, Smith T, Johnson C, King B, Handen B et al. (2019) An exploration of concomitant psychiatric disorders in children with autism spectrum disorder. *Compr Psychiatry* 88:57–64. doi: 10.1016/j.comppsy.2018.10.012

Lee JJ, Wedow R, Okbay A, Kong E, Maghziyan O, Zacher M, Nguyen-Viet TA, Bowers P, Sidorenko J, Karlsson Linnér R et al. (2018) Gene discovery and polygenic prediction from a genome-wide association study of educational attainment in 1.1 million individuals. *Nat Genet* 50:1112–1121. doi: 10.1038/s41588-018-0147-3

Lee PH, Anttila V, Won H, Feng YCA, Rosenthal J, Zhu Z, Tucker-Drob EM, Nivard MG, Grotzinger AD, Posthuma D et al. (2019) Genomic Relationships, Novel Loci, and Pleiotropic Mechanisms across Eight Psychiatric Disorders. *Cell* 179:1469-1482.e11. doi: 10.1016/j.cell.2019.11.020

Lee S, Wu MC and Lin X (2012) Optimal tests for rare variant effects in sequencing association studies. *Biostatistics* 13:762–75. doi: 10.1093/biostatistics/kxs014

Lesch K-P, Selch S, Renner TJ, Jacob C, Nguyen TT, Hahn T, Romanos M, Walitza S, Shoichet S, Dempfle A et al. (2011) Genome-wide copy number variation analysis in attention-deficit/hyperactivity disorder: association with neuropeptide Y gene dosage in an extended pedigree. *Mol Psychiatry* 16:491–503. doi: 10.1038/mp.2010.29

Levy SE, Mandell DS and Schultz RT (2009) Autism. *Lancet* (London, England) 374:1627–38. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61376-3

Linnér RK, Mallard TT, Barr PB, Sanchez-Roige S, Madole JW, Driver MN, Poore HE, Grotzinger AD, Tielbeek JJ, Johnson EC et al. (2020) Multivariate genomic analysis of 1.5 million people identifies genes related to addiction, antisocial behavior, and health. *bioRxiv* 2020.10.16.342501. doi: 10.1101/2020.10.16.342501

Lord C, Elsabbagh M, Baird G and Veenstra-Vanderweele J (2018) Autism spectrum disorder. *Lancet* (London, England) 392:508–520. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31129-2

Luo Y, Weibman D, Halperin JM and Li X (2019) A Review of Heterogeneity in Attention Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD). *Front Hum Neurosci*. doi: 10.3389/fnhum.2019.00042



Lyall K, Croen L, Daniels J, Fallin MD, Ladd-Acosta C, Lee BK, Park BY, Snyder NW, Schendel D, Volk H et al. (2017) The Changing Epidemiology of Autism Spectrum Disorders. *Annu Rev Public Health* 38:81–102. doi: 10.1146/annurev-publhealth-031816-044318

Marjoram P, Zubair A and Nuzhdin S V (2014) Post-GWAS: where next? More samples, more SNPs or more biology? *Heredity (Edinb)* 112:79–88. doi: 10.1038/hdy.2013.52

Marotta R, Risoleo MC, Messina G, Parisi L, Carotenuto M, Vetri L and Roccella M (2020) The Neurochemistry of Autism. *Brain Sci.* doi: 10.3390/brainsci10030163

Martin J, Hamshere ML, Stergiakouli E, O'Donovan MC and Thapar A (2014) Genetic risk for attention-deficit/hyperactivity disorder contributes to neurodevelopmental traits in the general population. *Biol Psychiatry* 76:664–671. doi: 10.1016/j.biopsych.2014.02.013

Martin J, O'Donovan MC, Thapar A, Langley K and Williams N (2015) The relative contribution of common and rare genetic variants to ADHD. *Transl Psychiatry* 5:e506–e506. doi: 10.1038/tp.2015.5

Martinez AF, Abe Y, Hong S, Molyneux K, Yarnell D, Löhr H, Driever W, Acosta MT, Arcos-Burgos M and Muenke M (2016) An Ultraconserved Brain-specific Enhancer within ADGRL3 (LPHN3) Underpins ADHD Susceptibility. *Biol Psychiatry.* doi: 10.1016/j.biopsych.2016.06.026

Martinez AF, Muenke M and Arcos-Burgos M (2011) From the black widow spider to human behavior: Latrophilins, a relatively unknown class of G protein-coupled receptors, are implicated in psychiatric disorders. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 156:1–10. doi: 10.1002/ajmg.b.31137

McGovern CW and Sigman M (2005) Continuity and change from early childhood to adolescence in autism. *J Child Psychol Psychiatry* 46:401–408. doi: 10.1111/j.1469-7610.2004.00361.x

McNeill R V., Palladino VS, Brunkhorst-Kanaan N, Grimm O, Reif A and Kittel-Schneider S (2020) Expression of the adult ADHD-associated gene ADGRL3 is dysregulated by risk variants and environmental risk factors. *World J Biol Psychiatry* 1–15. doi: 10.1080/15622975.2020.1809014

Middeldorp C (2016) A genome-wide association meta-analysis of attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms in population-based pediatric cohorts. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 55:896–905.

Miles JH (2011) Autism spectrum disorders-A genetics review. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181ff67ba

Modabbernia A, Velthorst E and Reichenberg A (2017) Environmental risk factors for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. *Mol Autism* 8:13. doi: 10.1186/s13229-017-0121-4

- Moncrieff J and Timimi S (2010) Is ADHD a valid diagnosis in adults? No. *BMJ* 340:c547–c547. doi: 10.1136/bmj.c547
- Morrison JR and Stewart MA (1971) A family study of the hyperactive child syndrome. *Biol Psychiatry* 3:189–195.
- Mortensen O V (2013) MKP3 eliminates depolarization-dependent neurotransmitter release through downregulation of L-type calcium channel Cav1.2 expression. *Cell Calcium* 53:224–30. doi: 10.1016/j.ceca.2012.12.004
- Newschaffer CJ, Croen LA, Daniels J, Giarelli E, Grether JK, Levy SE, Mandell DS, Miller LA, Pinto-Martin J, Reaven J et al. (2007) The Epidemiology of Autism Spectrum Disorders. *Annu Rev Public Health* 28:235–258. doi: 10.1146/annurev.publhealth.28.021406.144007
- O’Sullivan M, Wit J De and Savas J (2012a) Postsynaptic FLRT proteins are endogenous ligands for the black widow spider venom receptor Latrophilin and regulate excitatory synapse development. *Neuron* 73:903–910. doi: 10.1016/j.neuron.2012.01.018.Postsynaptic
- O’Sullivan ML, de Wit J, Savas JN, Comoletti D, Otto-Hitt S, Yates JR and Ghosh A (2012) FLRT Proteins Are Endogenous Latrophilin Ligands and Regulate Excitatory Synapse Development. *Neuron* 73:903–910. doi: 10.1016/j.neuron.2012.01.018
- Orsini CA, Setlow B, DeJesus M, Galaviz S, Loesch K, Ioerger T and Wallis D (2016) Behavioral and transcriptomic profiling of mice null for *Lphn3*, a gene implicated in ADHD and addiction. *Mol Genet genomic Med* 4:322–43. doi: 10.1002/mgg3.207
- Pingault J-B, Viding E, Galéra C, Greven CU, Zheng Y, Plomin R and Rijdsdijk F (2015) Genetic and Environmental Influences on the Developmental Course of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Symptoms From Childhood to Adolescence. *JAMA Psychiatry* 72:651. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2015.0469
- Pinto R, Asherson P, Iliot N, Cheung CHM and Kuntsi J (2016) Testing for the mediating role of endophenotypes using molecular genetic data in a twin study of ADHD traits. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet*. doi: 10.1002/ajmg.b.32463
- Poelmans G, Pauls DL, Buitelaar JK and Franke B (2011) Integrated genome-wide association study findings: identification of a neurodevelopmental network for attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* 168:365–77. doi: 10.1176/appi.ajp.2010.10070948
- Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, Biederman J and Rohde LA (2007) The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry* 164:942–948. doi: 10.1176/ajp.2007.164.6.942
- Polanczyk G V., Salum GA, Sugaya LS, Caye A and Rohde LA (2015) Annual research

review: A meta-analysis of the worldwide prevalence of mental disorders in children and adolescents. *J Child Psychol Psychiatry Allied Discip* 56:345–365. doi: 10.1111/jcpp.12381

Pourcain BS, Robinson EB, Anttila V, Sullivan BB, Maller J, Golding J, Skuse D, Ring S, Evans DM, Zammit S et al. (2018) ASD and schizophrenia show distinct developmental profiles in common genetic overlap with population-based social communication difficulties. *Mol Psychiatry* 23:263–270. doi: 10.1038/mp.2016.198

Purper-Ouakil D, Ramoz N, Lepagnol-Bestel, Aude-Marie Gorwood P and Simonneau M (2011) Neurobiology of attention deficit/hyperactivity disorder. *Pediatr Res* 69:69–76. doi: 10.1203/PDR.0b013e318212b40f

Ramos-Quiroga J-A, Sánchez-Mora C, Casas M, Garcia-Martínez I, Bosch R, Nogueira M, Corrales M, Palomar G, Vidal R, Coll-Tané M et al. (2014) Genome-wide copy number variation analysis in adult attention-deficit and hyperactivity disorder. *J Psychiatr Res* 49:60–7. doi: 10.1016/j.jpsychires.2013.10.022

Rapin I and Tuchman RF (2008) Autism: definition, neurobiology, screening, diagnosis. *Pediatr Clin North Am* 55:1129–46, viii. doi: 10.1016/j.pcl.2008.07.005

Reale L, Bartoli B, Cartabia M, Zanetti M, Costantino MA, Canevini MP, Termine C, Bonati M and Lombardy ADHD Group (2017) Comorbidity prevalence and treatment outcome in children and adolescents with ADHD. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 26:1443–1457. doi: 10.1007/s00787-017-1005-z

Reuter I, Knaup S, Romanos M, Lesch K-P, Drepper C and Lillesaar C (2016) Developmental exposure to acetaminophen does not induce hyperactivity in zebrafish larvae. *J Neural Transm.* doi: 10.1007/s00702-016-1556-z

Ribasés M, Ramos-Quiroga JA, Sánchez-Mora C, Bosch R, Richarte V, Palomar G, Gastaminza X, Bielsa A, Arcos-Burgos M, Muenke M et al. (2011) Contribution of LPHN3 to the genetic susceptibility to ADHD in adulthood: A replication study. *Genes, Brain Behav* 10:149–157. doi: 10.1111/j.1601-183X.2010.00649.x

Ribasés M, Sánchez-Mora C, Ramos-Quiroga JA, Bosch R, Gómez N, Nogueira M, Corrales M, Palomar G, Jacob CP, Gross-Lesch S et al. (2012) An association study of sequence variants in the forkhead box P2 (FOXP2) gene and adulthood attention-deficit/hyperactivity disorder in two European samples. *Psychiatr Genet* 22:155–60. doi: 10.1097/YPG.0b013e328353957e

Ripke S, Neale BM, Corvin A, Walters JTR, Farh K-H, Holmans P a., Lee P, Bulik-Sullivan B, Collier D a., Huang H et al. (2014) Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* 511:421–427. doi: 10.1038/nature13595

Robinson EB, St Pourcain B, Anttila V, Kosmicki JA, Bulik-Sullivan B, Grove J, Maller J, Samocha KE, Sanders SJ, Ripke S et al. (2016) Genetic risk for autism spectrum disorders and neuropsychiatric variation in the general population. *Nat Genet* 48:552–555. doi:

10.1038/ng.3529

Rocha H, Sampaio M, Rocha R, Fernandes S and Leão M (2016) MEF2C haploinsufficiency syndrome: Report of a new MEF2C mutation and review. *Eur J Med Genet* 59:478–482. doi: 10.1016/j.ejmg.2016.05.017

Rommelse NNJ, Geurts HM, Franke B, Buitelaar JK and Hartman CA (2011) A review on cognitive and brain endophenotypes that may be common in autism spectrum disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder and facilitate the search for pleiotropic genes. *Neurosci Biobehav Rev* 35:1363–1396. doi: 10.1016/j.neubiorev.2011.02.015

Ronald A, Happé F, Price TS, Baron-Cohen S and Plomin R (2006) Phenotypic and genetic overlap between autistic traits at the extremes of the general population. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 45:1206–1214. doi: 10.1097/01.chi.0000230165.54117.41

Ronald A, Simonoff E, Kuntsi J, Asherson P and Plomin R (2008) Evidence for overlapping genetic influences on autistic and ADHD behaviours in a community twin sample. *J Child Psychol Psychiatry Allied Discip* 49:535–542. doi: 10.1111/j.1469-7610.2007.01857.x

Rovira P, Demontis D, Sánchez-Mora C, Zayats T, Klein M, Mota NR, Weber H, Garcia-Martínez I, Payerols M, Vilar-Ribó L et al. (2020) Shared genetic background between children and adults with attention deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychopharmacology* 45:1617–1626. doi: 10.1038/s41386-020-0664-5

Ruderfer DM, Fanous AH, Ripke S, McQuillin A, Amdur RL, Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Bipolar Disorder Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Cross-Disorder Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Gejman P V, O'Donovan MC et al. (2014) Polygenic dissection of diagnosis and clinical dimensions of bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 19:1017–1024. doi: 10.1038/mp.2013.138

Ruzzo EK, Pérez-Cano L, Jung JY, Wang L kai, Kashef-Haghighi D, Hartl C, Singh C, Xu J, Hoekstra JN, Leventhal O et al. (2019) Inherited and De Novo Genetic Risk for Autism Impacts Shared Networks. *Cell* 178:850-866.e26. doi: 10.1016/j.cell.2019.07.015

Sanders SJ, Neale BM, Huang H, Werling DM, An J-Y, Dong S, Abecasis G, Arguella PA, Blangero J, Boehnke M et al. (2017) Whole genome sequencing in psychiatric disorders: the WGSPD consortium. *Nat Neurosci* 20:1661–1668. doi: 10.1038/s41593-017-0017-9

Satterstrom FK, Kosmicki JA, Wang J, Breen MS, De Rubeis S, An JY, Peng M, Collins R, Grove J, Klei L et al. (2020) Large-Scale Exome Sequencing Study Implicates Both Developmental and Functional Changes in the Neurobiology of Autism. *Cell* 180:568-584.e23. doi: 10.1016/j.cell.2019.12.036

Satterstrom FK, Walters RK, Singh T, Wigdor EM, Lescai F, Demontis D, Kosmicki JA, Grove J, Stevens C, Bybjerg-Grauholm J et al. (2019) Autism spectrum disorder and attention deficit hyperactivity disorder have a similar burden of rare protein-truncating variants.

Nat Neurosci 22:1961–1965. doi: 10.1038/s41593-019-0527-8

Scassellati C, Bonvicini C, Faraone S V and Gennarelli M (2012) Biomarkers and attention-deficit/hyperactivity disorder: a systematic review and meta-analyses. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 51:1003-1019.e20. doi: 10.1016/j.jaac.2012.08.015

Schmitt OM (1970) Melchior Adam Weikard: Arzt, Philosoph u. Aufklärer. Parzeller

Shaw M, Hodgkins P, Caci H, Young S, Kahle J, Woods AG and Arnold LE (2012) A systematic review and analysis of long-term outcomes in attention deficit hyperactivity disorder: effects of treatment and non-treatment. *BMC Med* 10:99. doi: 10.1186/1741-7015-10-99

Simonoff E, Pickles A, Charman T, Chandler S, Loucas T and Baird G (2008) Psychiatric disorders in children with autism spectrum disorders: Prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 47:921–929. doi: 10.1097/CHI.0b013e318179964f

Stergiakouli E, Martin J, Hamshere ML, Langley K, Evans DM, St Pourcain B, Timpson NJ, Owen MJ, O'Donovan M, Thapar A et al. (2015) Shared Genetic Influences Between Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) Traits in Children and Clinical ADHD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 54:322–327. doi: 10.1016/j.jaac.2015.01.010

Stergiakouli E and Thapar A (2010) Fitting the pieces together: current research on the genetic basis of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Neuropsychiatr Dis Treat* 6:551–560. doi: 10.2147/NDT.S11322

Stessman HAF, Xiong B, Coe BP, Wang T, Hoekzema K, Fencikova M, Kvarnung M, Gerds J, Trinh S, Cosemans N et al. (2017) Targeted sequencing identifies 91 neurodevelopmental-disorder risk genes with autism and developmental-disability biases. *Nat Genet* 49:515–526. doi: 10.1038/ng.3792

Still GF (1902) The Goulstonian Lectures ON SOME ABNORMAL PSYCHICAL CONDITIONS IN CHILDREN. *Lancet* 159:1163–1168. doi: 10.1016/S0140-6736(01)74901-X

Tammimies K (2019) Genetic mechanisms of regression in autism spectrum disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 102:208–220. doi: 10.1016/j.neubiorev.2019.04.022

Taylor LE, Swerdfeger AL and Eslick GD (2014) Vaccines are not associated with autism: an evidence-based meta-analysis of case-control and cohort studies. *Vaccine* 32:3623–9. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.04.085

Taylor MJ, Charman T and Ronald A (2015) Where are the strongest associations between autistic traits and traits of ADHD? evidence from a community-based twin study. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 24:1129–1138. doi: 10.1007/s00787-014-0666-0

Taylor MJ, Martin J, Lu Y, Brikell I, Lundström S, Larsson H and Lichtenstein P (2019) Association of Genetic Risk Factors for Psychiatric Disorders and Traits of These Disorders

in a Swedish Population Twin Sample. *JAMA Psychiatry* 76:280–289. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2018.3652

Thapar A, Cooper M and Rutter M (2017) Neurodevelopmental disorders. *The Lancet Psychiatry* 4:339–346. doi: 10.1016/S2215-0366(16)30376-5

Thapar A, Martin J, Mick E, Arias Vásquez A, Langley K, Scherer SW, Schachar R, Crosbie J, Williams N, Franke B et al. (2015) Psychiatric gene discoveries shape evidence on ADHD's biology. *Mol Psychiatry* 1–6. doi: 10.1038/mp.2015.163

Tick B, Bolton P, Happé F, Rutter M and Rijdsdijk F (2016) Heritability of autism spectrum disorders: a meta-analysis of twin studies. *J Child Psychol Psychiatry* 57:585–595. doi: 10.1111/jcpp.12499

Uchino S and Waga C (2013) SHANK3 as an autism spectrum disorder-associated gene. *Brain Dev* 35:106–10. doi: 10.1016/j.braindev.2012.05.013

Underwood JFG, Kendall KM, Berrett J, Lewis C, Anney R, Van Den Bree MBM and Hall J (2019) Autism spectrum disorder diagnosis in adults: Phenotype and genotype findings from a clinically derived cohort. *Br J Psychiatry* 215:647–653. doi: 10.1192/bjp.2019.30

van der Meer JMJ, Lappenschaar MGA, Hartman CA, Greven CU, Buitelaar JK and Rommelse NNJ (2017) Homogeneous Combinations of ASD–ADHD Traits and Their Cognitive and Behavioral Correlates in a Population-Based Sample. *J Atten Disord* 21:753–763. doi: 10.1177/1087054714533194

van der Voet M, Harich B, Franke B and Schenck a (2015) ADHD-associated dopamine transporter, latrophilin and neurofibromin share a dopamine-related locomotor signature in *Drosophila*. *Mol Psychiatry* 10:1–9. doi: 10.1038/mp.2015.55

van Ewijk H, Heslenfeld DJ, Zwiers MP, Buitelaar JK and Oosterlaan J (2012) Diffusion tensor imaging in attention deficit/hyperactivity disorder: A systematic review and meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev* 36:1093–1106. doi: 10.1016/j.neubiorev.2012.01.003

Van Rooij D, Anagnostou E, Arango C, Auzias G, Behrmann M, Busatto GF, Calderoni S, Daly E, Deruelle C, Di Martino A et al. (2018) Cortical and subcortical brain morphometry differences between patients with autism spectrum disorder and healthy individuals across the lifespan: Results from the ENIGMA ASD working group. *Am J Psychiatry* 175:359–369. doi: 10.1176/appi.ajp.2017.17010100

Victor MM, da Silva BS, Kappel DB, Bau CHD and Grevet EH (2018) Attention-deficit hyperactivity disorder in ancient Greece: The Obtuse Man of Theophrastus. *Aust N Z J Psychiatry*. doi: 10.1177/0004867418769743

Visscher PM, Wray NR, Zhang Q, Sklar P, McCarthy MI, Brown MA and Yang J (2017) 10 Years of GWAS Discovery: Biology, Function, and Translation. *Am J Hum Genet* 101:5–22. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.06.005

- Wainschtein P, Jain D, Yengo L, Zheng Z, Cupples LA, Shadyab A, McKnight B, Shoemaker B, Mitchell B, Psaty B et al. (2019) Recovery of trait heritability from whole genome sequence data. *bioRxiv*. doi: 10.1101/588020
- Wallis D, Hill DS, Mendez IA, Abbott LC, Finnell RH, Wellman PJ and Setlow B (2012) Initial characterization of mice null for *Lphn3*, a gene implicated in ADHD and addiction. *Brain Res* 1463:85–92. doi: 10.1016/j.brainres.2012.04.053
- Warrier V, Chee V, Smith P, Chakrabarti B and Baron-Cohen S (2015) A comprehensive meta-analysis of common genetic variants in autism spectrum conditions. *Mol Autism* 6:49. doi: 10.1186/s13229-015-0041-0
- Williams NM, Zaharieva I, Martin A, Langley K, Mantripragada K, Fossdal R, Stefansson H, Stefansson K, Magnusson P, Gudmundsson OO et al. (2010) Rare chromosomal deletions and duplications in attention-deficit hyperactivity disorder: A genome-wide analysis. *Lancet* 376:1401–1408. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61109-9
- Wray NR, Lee SH, Mehta D, Vinkhuyzen AAE, Dudbridge F and Middeldorp CM (2014) Research Review: Polygenic methods and their application to psychiatric traits. *J Child Psychol Psychiatry Allied Discip* 55:1068–1087. doi: 10.1111/jcpp.12295
- Wray NR, Ripke S, Mattheisen M, Trzaskowski M, Byrne EM, Abdellaoui A, Adams MJ, Agerbo E, Air TM, Andlauer TMF et al. (2018) Genome-wide association analyses identify 44 risk variants and refine the genetic architecture of major depression. *Nat Genet* 50:668–681. doi: 10.1038/s41588-018-0090-3
- Wu MC, Lee S, Cai T, Li Y, Boehnke M and Lin X (2011) Rare-Variant Association Testing for Sequencing Data with the Sequence Kernel Association Test. *Am J Hum Genet* 89:82–93. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.05.029
- Yamagishi S, Hampel F, Hata K, Del Toro D, Schwark M, Kvachnina E, Bastmeyer M, Yamashita T, Tarabykin V, Klein R et al. (2011) FLRT2 and FLRT3 act as repulsive guidance cues for *Unc5*-positive neurons. *EMBO J* 30:2920–33. doi: 10.1038/emboj.2011.189
- Zayats T, Jacobsen KK, Kleppe R, Jacob CP, Kittel-Schneider S, Ribasés M, Ramos-Quiroga JA, Richarte V, Casas M, Mota NR et al. (2016) Exome chip analyses in adult attention deficit hyperactivity disorder. *Transl Psychiatry* 6:e923–e923. doi: 10.1038/tp.2016.196
- Zhang Q, Cai Z, Lhomme M, Sahana G, Lesnik P, Guerin M, Fredholm M and Karlskov-Mortensen P (2020) Inclusion of endophenotypes in a standard GWAS facilitate a detailed mechanistic understanding of genetic elements that control blood lipid levels. *Sci Rep* 10:18434. doi: 10.1038/s41598-020-75612-6

# Apêndice







# Meta-analysis and systematic review of *ADGRL3* (*LPHN3*) polymorphisms in ADHD susceptibility

E. M. Bruxel<sup>1,2</sup> · C. R. Moreira-Maia<sup>2</sup> · G. C. Akutagava-Martins<sup>1,2,3</sup> · T. P. Quinn<sup>4</sup> · M. Klein<sup>5,6</sup> · B. Franke<sup>5,7</sup> · M. Ribasés<sup>8,9,10,11</sup> · P. Rovira<sup>8,10</sup> · C. Sánchez-Mora<sup>8,9,10,11</sup> · D. B. Kappel<sup>1,12</sup> · N. R. Mota<sup>5,7,12</sup> · E. H. Grevet<sup>12,13</sup> · C. H. D. Bau<sup>1,12</sup> · M. Arcos-Burgos<sup>14</sup> · L. A. Rohde<sup>2,15</sup> · M. H. Hutz<sup>1,2</sup>

Received: 12 November 2018 / Revised: 13 January 2020 / Accepted: 30 January 2020  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2020

## Abstract

The gene encoding adhesion G protein-coupled receptor L3 (*ADGRL3*, also referred to as latrophilin 3 or *LPHN3*) has been associated with ADHD susceptibility in independent ADHD samples. We conducted a systematic review and a comprehensive meta-analysis to summarize the associations between the most studied *ADGRL3* polymorphisms (rs6551665, rs1947274, rs1947275, and rs2345039) and both childhood and adulthood ADHD. Eight association studies (seven published and one unpublished) fulfilled criteria for inclusion in our meta-analysis. We also incorporated GWAS data for *ADGRL3*. In order to avoid overlapping samples, we started with summary statistics from GWAS samples and then added data from gene association studies. The results of our meta-analysis suggest an effect of *ADGRL3* variants on ADHD susceptibility in children ( $n = 8724/14,644$  cases/controls and 1893 families): rs6551665 A allele ( $Z$  score =  $-2.701$ ;  $p = 0.0069$ ); rs1947274 A allele ( $Z$  score =  $-2.033$ ;  $p = 0.0421$ ); rs1947275 T allele ( $Z$  score =  $2.339$ ;  $p = 0.0978$ ); and rs2345039 C allele ( $Z$  score =  $3.806$ ;  $p = 0.0026$ ). Heterogeneity was found in analyses for three SNPs (rs6551665, rs1947274, and rs2345039). In adults, results were not significant ( $n = 6532$  cases/15,874 controls): rs6551665 A allele ( $Z$  score =  $2.005$ ;  $p = 0.0450$ ); rs1947274 A allele ( $Z$  score =  $2.179$ ;  $p = 0.0293$ ); rs1947275 T allele ( $Z$  score =  $-0.822$ ;  $p = 0.4109$ ); and rs2345039 C allele ( $Z$  score =  $-1.544$ ;  $p = 0.1226$ ). Heterogeneity was found just for rs6551665. In addition, funnel plots did not suggest publication biases. Consistent with *ADGRL3*'s role in early neurodevelopment, our findings suggest that the gene is predominantly associated with childhood ADHD.

## Introduction

Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is a neurodevelopmental disorder characterized by persistent and age-inappropriate patterns of inattention, hyperactivity, and impulsivity [1]. The worldwide prevalence for ADHD is estimated to be around 3.4% for school-aged children and adolescents [2] and 2.4% for adults [3].

The etiology of ADHD is multifactorial, and the symptoms may manifest to a different extent throughout the lifespan [4]. The estimated heritability based on genome-wide single-

nucleotide polymorphisms (SNPs) for ADHD is 21.6% [5], which is considerably less than it is estimated by family-based studies, 74% [6]. Candidate gene analyses of SNPs have so far only identified variants that have each a very small effect, which together still explain only a limited proportion of ADHD variability [7]. Recently, a GWAS meta-analysis reported 12 independent loci associated with ADHD. It implicates genes involved in neurodevelopmental processes and neurotransmitter homeostasis as *FOXP2* and *DUSP6*, respectively, and other constrained regions of the genome as important contributors to the etiology of ADHD [5].

The gene encoding the adhesion G protein-coupled receptor L3 (*ADGRL3*, also known as latrophilin 3 or *LPHN3*) was found through fine-mapping of a genetic linkage region for ADHD observed in a genetically isolated population [8], and has subsequently received corroborating evidence for its link with ADHD from both human and animal studies. In humans, a common *ADGRL3* haplotype was associated with ADHD susceptibility, a finding that

**Supplementary information** The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41380-020-0673-0>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ M. H. Hutz  
mara.hutz@ufrgs.br

Extended author information available on the last page of the article

Published online: 12 February 2020

SPRINGER NATURE

was replicated in independent samples of both childhood and adulthood ADHD [9–13]. In animals, a loss of function of *adgrl3.1* during zebrafish development as well as a null mutant *Adgrl3* gene in mice were shown to cause altered expression of dopaminergic and serotonergic genes, along with a hyperactive phenotype. From this work, it may be hypothesized that *ADGRL3* genotype influences ADHD through alterations in monoamine signaling [14, 15].

*ADGRL3* and its ligands seem to be important in determining the connectivity rates between main neurons in the cortex during neurodevelopment [16]. Analysis of brain tissue transcriptomes at different developmental time points in mice null for *Adgrl3* suggests that gene expression is altered for cell adhesion molecules and calcium signaling proteins that may affect neuronal structure and function [17]. An extended study with *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* experiments identified an ultraconserved element in the evolutionary conserved region 47 (ECR47) that functions as a transcriptional enhancer within *ADGRL3* [18]. These authors also reported an ADHD risk haplotype (formed by rs17226398, rs56038622, and rs2271338), which reduced enhancer activity by 40% in neuroblastoma and astrocytoma cell lines. The rs2271338 risk allele disrupts the binding of YY1 transcription factor, which binds to ECR47 and plays an important role in the central nervous system development and function. Moreover, brain expression data indicate that *ADGRL3* has maximum expression across fetal and infant stages (and relatively high expression levels throughout life), suggesting that this gene is necessary for proper brain function [18]. However, knockdown of YY1 does not affect *ADGRL3* expression in differentiated cells, suggesting that ECR47 may be active only during developmental stages, when *ADGRL3* expression is higher [18].

Here, we conducted the first *ADGRL3* systematic review and comprehensive meta-analysis of the associations of the most studied polymorphisms (rs6551665, rs1947274, rs1947275, and rs2345039) with both childhood and adulthood ADHD samples. With this, we aimed to strengthen or refute the evidence for the role of *ADGRL3* variants in the susceptibility for ADHD.

## Methods

### Publication search

We searched the electronic databases PubMed, EMBASE, Cochrane, PsycINFO, Google Scholar, and Web of Science (Science Citation Index Expanded; Social Sciences Citation Index; Arts & Humanities Citation Index; Conference Proceedings Citation Index-Science [CPCI-S]; CPSI-Social Science & Humanities) up to September 2019. The search terms used were “attention-deficit hyperactivity disorder”

or “ADHD” and related terms such as “latrophilin 3,” “LPHN3,” or “ADGRL3,” with no date or language restriction. We considered for inclusion not only published papers, but also those accepted for publication (i.e., online first and/or ahead of print). We also manually searched references from the included studies and reviews in order to select relevant studies not found in the electronic literature search. Researchers with expertise on ADHD genetics were contacted by e-mail in order to obtain information of ongoing studies.

### Study inclusion and exclusion

Three independent reviewers performed the abstract and full-text screening process (as well as the data extraction). Two independent reviewers solved disagreements between the three reviewers. If the same group of patients was described in more than one paper, the priority for inclusion in the meta-analysis was based on the following criteria (in order): (1) most complete data, and (2) largest sample size.

We included all family-based studies (i.e., employing the transmission disequilibrium test and case–control studies published in peer-reviewed journals in any language, comprising the following SNPs: rs6551665 (putative risk allele G), rs1947274 (putative risk allele C), rs2345039 (putative risk allele C), and rs1947275 (putative risk allele T). ADHD subjects of all ethnicities and age groups were included as long as they (1) met the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders ADHD diagnosis criteria, (2) had a measured intelligence quotient test score above 70, and (3) were not diagnosed with any comorbid genetic or neurological disorder. In addition, we included studies with information on dimensional diagnosis according to ADHD rating scales. We also incorporated GWAS data from Demontis et al. [5] and Rovira et al. [19] for *ADGRL3*. In order to avoid overlapping samples, we started with summary statistics from samples included in the GWAS and then added data from gene association studies.

We excluded reviews, animal studies, letters, commentaries, and case reports.

### Data extraction

We collected the following information from each study: authors, year of publication, country, type of sample data (i.e., family-based or case–control), age, and gender in each group. Whenever necessary, authors of the included studies were contacted by e-mail for additional data or clarification.

### Statistical analysis

Meta-analyses were performed using the METAL software [20]. A reference allele was selected and a z-statistic

characterizing the evidence for association was calculated. The z-statistic summarized the magnitude and the direction of effect relative to the reference allele and all studies were aligned to the same reference allele. Next, an overall z-statistic and *p* value were then calculated from a weighted sum of the individual statistics. Weights were proportional to the square root of the number of individuals examined in each sample and selected such that the squared weights sum up to 1. Very negative *Z* scores indicated a small *p* value and an allele associated with lower disease risk, whereas large positive *Z* scores indicated a small *p* value and an allele associated with higher disease risk [20]. Forest plots were created with the “forestplot” R package (version 3.6.1). Heterogeneity in effect sizes across studies was tested using the Q-statistic based in  $\chi^2$  test, and a *p* value  $\leq 0.05$  was considered significant. Tests for publication bias were not feasible as we found less than four studies for three of the polymorphisms (i.e., rs1947274, rs1947275, and rs2345039), and only seven studies for the remaining polymorphism (i.e., rs6551665) [21]. However, funnel plots were created to visualize possible publication biases that are shown as supplementary material (Supplementary Figs. 1 and 2). The meta-analysis significance level was set at 0.0125 after adjusting for multiple testing using Bonferroni correction.

Results from gene-based analyses for the *ADGRL3* gene in children and adults with persistent ADHD separately were obtained from Rovira et al. [19].

## Results

The literature search identified 301 publications. After reviewing all abstracts, we selected 26 articles; full text and references were reviewed. Three studies were excluded after three failed attempts to contact the authors for clarification. Seven association studies fulfilled the inclusion criteria and were included in this review, along with one unpublished study (Fig. 1). One study had six independent samples; five family-based samples and one case-control sample [8]; the other seven studies were of case-control design [9–13, 22, and an unpublished study]. The descriptive characteristics of these studies are listed in Table 1.

Information of GWAS data on ADHD in adults and in children can be found in the Supplementary information of Demontis et al. [5] and Rovira et al. [19]. Data from four gene association studies [8, 9, 13, 22] were included because they do not overlap sample with the GWAS data. All datasets were included in the meta-analysis for rs6551665; for the other SNPs (i.e., rs1947274, rs1947275, and rs2345039) 22, 21, and 22 datasets were included, respectively.

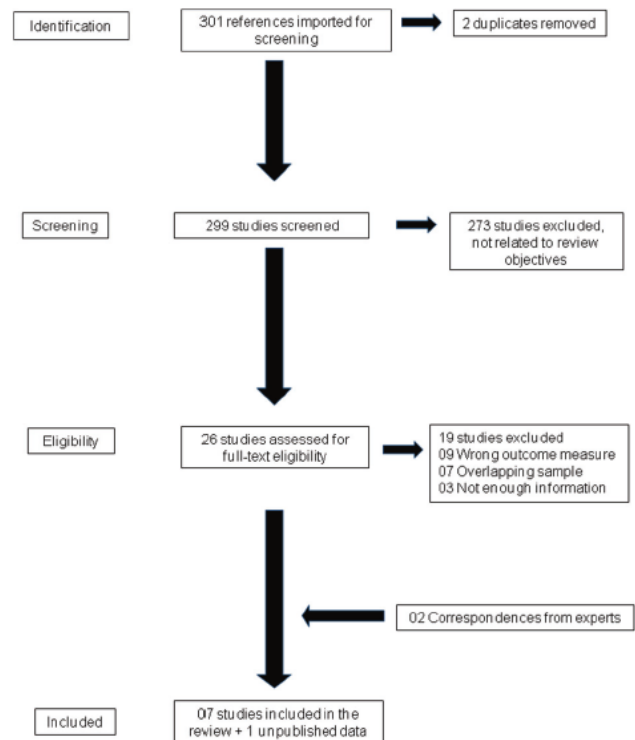


Fig. 1 Selection of studies included in the systematic review.

Pairwise linkage disequilibrium between SNPs described at the 1000 Genomes Project for CEU sample vary: rs6551665–rs1947274 ( $D' = 0.99$ ,  $r^2 = 0.96$ ); rs6551665–rs1947275 ( $D' = 0.89$ ,  $r^2 = 0.33$ ); rs6551665–rs2345039 ( $D' = 0.66$ ,  $r^2 = 0.33$ ); rs1947274–rs1947275 ( $D' = 0.99$ ,  $r^2 = 0.39$ ); rs1947274–rs2345039 ( $D' = 0.67$ ,  $r^2 = 0.39$ ); rs1947275–rs2345039 ( $D' = 0.69$ ,  $r^2 = 0.15$ ).

First, we grouped childhood and adulthood samples to observe the pooled effect. The pooled results indicate no significant result for association between all SNPs: for rs6551665 A allele ( $Z$  score =  $-0.481$ ;  $p = 0.6306$ ;  $Q\chi^2 = 61.42$ ,  $p = 1.38E-02$ ); rs1947274 A allele ( $Z$  score =  $-0.196$ ;  $p = 0.8443$ ;  $Q\chi^2 = 42.88$ ,  $p = 0.0021$ ); rs1947275 T allele ( $Z$  score =  $0.473$ ;  $p = 0.6360$ ;  $Q\chi^2 = 25.87$ ,  $p = 0.1338$ ); and rs2345039 C allele ( $Z$  score =  $1.012$ ;  $p = 0.3114$ ;  $Q\chi^2 = 38.87$ ,  $p = 0.0069$ ) (Table 2). The heterogeneity analyses between studies were significant for three SNPs.

Next, meta-analyses for childhood and adulthood samples were performed separately. These results showed significant associations for two SNPs in childhood samples: rs6551665 A allele ( $Z$  score =  $-2.701$ ;  $p = 0.0069$ ;  $Q\chi^2 = 38.31$ ,  $p = 0.0005$ ); rs1947274 A allele ( $Z$  score =  $-2.033$ ;  $p = 0.0421$ ;  $Q\chi^2 = 23.04$ ,  $p = 0.0274$ ). The other showed negative results: rs1947275 T allele ( $Z$  score =  $2.339$ ;  $p = 0.0978$ ;  $Q\chi^2 = 17.66$ ,  $p = 0.0899$ ); and rs2345039 C allele ( $Z$  score =  $3.806$ ;  $p = 0.0026$ ;  $Q\chi^2 = 23.06$ ,  $p = 0.0272$ ) (Table 2). Forest plots show the association analysis of

**Table 1** Descriptive characteristics of association studies.

Study	Country	Ethnicity*	Mean age ( $\pm$ SD)**	Adult/Child sample	Number of individuals included	
					Case/Control	Family based
Arcos-Burgos et al. [8]	Colombia	Paisa	4.4 (2.4)	Child	–	155
Arcos-Burgos et al. [8]	USA (1)	NS	NS***	Child	–	316
Hwang et al. [9]	Korean	Asian (100%/100%)	8.05 (1.04)/8.22 (1.48)	Child	150/322	–
Huang et al. [13]	Chinese	Asian (100%/100%)	8.23 (1.49)/8.15 (1.42)	Child	473/585	–
Acosta et al. [22]	USA	Caucasian (61%/NS)	8.5 (0.80)/10.4(1.08)	Child	232/139	–
Arcos-Burgos et al. [8]	Spain	Caucasian (100%)	9.18 (2.56)	Child	–	386
Arcos-Burgos et al. [8]	USA (2)	Caucasian (100%)	10.1 (3.2)	Child	–	322
Bruxel et al. [11]	Brazil	Caucasian (77.6%/75.8%)	10.56 (3.16)/11.77 (3.26)	Child	523/132	–
Arcos-Burgos et al. [8]	Germany	Caucasian (100%)	11.4 (3.1)	Child	–	231
Marta Ribases et al. (2011) and additional data	Spain	Caucasian (100%/100%)	33.18 (10.61)/43.37 (14.09)	Adult	845/554	–
Kappel et al. [12]	Brazil	Caucasian (100%/100%)	33.69 (10.81)/29.08 (8.66)	Adult	576/649	–
Arcos-Burgos et al. [8]	Norway	Caucasian (100%)	34.4/NS	Adult	450/585	–
Franke et al. (unpublished data)	The Netherlands	Caucasian (100%/100%)	37.53 (10.33)/37.15 (11.491)	Adult	115/110	–

a–f: different samples present in Arcos-Burgos et al. (2010).

SD standard deviation, NS not stated.

\*Presented in % for cases and controls, respectively.

\*\*Presented mean age of the offspring of family-based samples and for cases and controls, respectively.

\*\*\*Mean age is not stated, but age range of ADHD proband is reported to be between 7 and 18 years.

*ADGRL3* SNPs with ADHD risk in the childhood sample according to risk allele (Fig. 2). The results for adulthood samples were not significant for all SNPs: rs6551665 A allele ( $Z$  score = 2.005;  $p$  = 0.0450;  $Q\chi^2$  = 15.94,  $p$  = 0.0433); rs1947274 A allele ( $Z$  score = 2.179;  $p$  = 0.0293;  $Q\chi^2$  = 15.17,  $p$  = 0.0558; rs1947275 T allele ( $Z$  score = -0.822;  $p$  = 0.4109;  $Q\chi^2$  = 7.75,  $p$  = 0.4582); and rs2345039 C allele ( $Z$  score = -1.544;  $p$  = 0.1226;  $Q\chi^2$  = 8.08,  $p$  = 0.4260) (Table 2). The heterogeneity analyses were significant for three SNPs in childhood samples and for one SNP in adult samples. Forest plots show the association analysis of *ADGRL3* SNPs with ADHD risk in the adult sample according to risk allele (Fig. 3). Moreover, funnel plots did not indicate publication biases although there is greater dispersion in childhood than in adulthood data (Supplementary Figs. 1 and 2).

The gene-wide analysis for children was nominally significant ( $Z$ stat = 24.23;  $p$  = 0.008) (Supplemental Table 1) [19].

## Discussion

Our meta-analysis results suggest an effect of *ADGRL3* variants on ADHD susceptibility, and their association with the disorder seems to be stronger for childhood than adulthood. This gene is highly expressed in amygdala, caudate nucleus, cerebellum, and cerebral cortex [8]. Like *ADGRL3*, other ADHD-associated genes with a developmental role are involved in the formation and activity of

synapses (e.g., *CDH13* and *FOXP2*), contributing to the hypothesis that different genes could affect brain development at different stages of the lifespan [23].

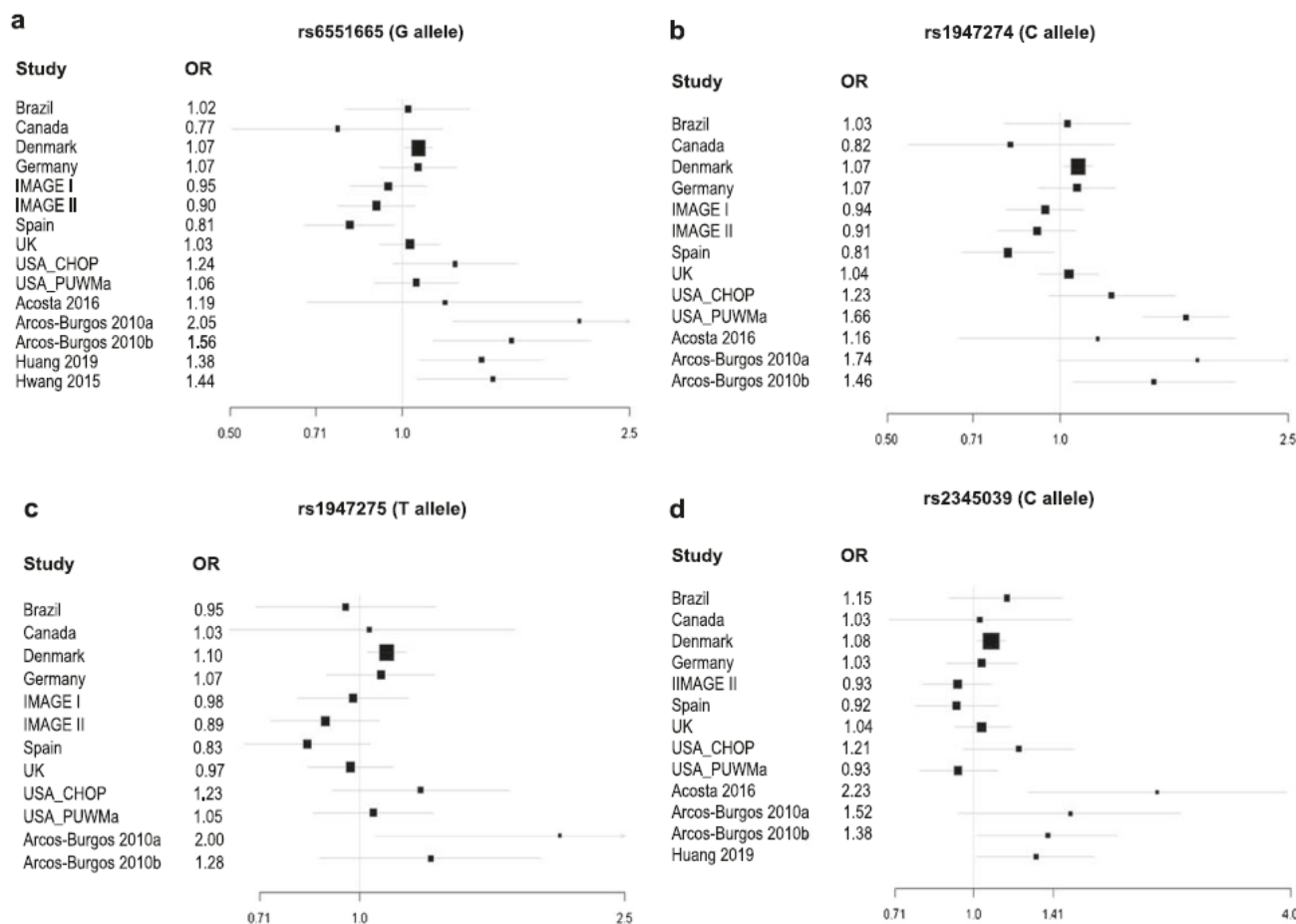
The GWAS meta-analysis on ADHD conducted by the PGC and iPSYCH consortia identified 12 independent loci associated with ADHD [5]. *ADGRL3* SNPs are not included among them. The variants analyzed in the GWAS meta-analysis presented ORs that ranged from 0.98 to 1.02, all with  $p$  values > 0.1 in the GWAS. There are several possible explanations for the discrepancy between the results. First, publication bias for significant associations may also have influenced our results. Second, the samples included in the GWAS meta-analysis are from 12 different cohorts in which ADHD subtypes, comorbidities, and neurocognitive endophenotypes combined in different ways may have increased phenotypic heterogeneity, making effects of some genes more difficult to detect.

It is important to keep in mind that the 12 significant loci in the previous GWAS meta-analysis on ADHD showed ORs that ranged from 1.077 to 1.198, capturing only a tiny fraction of common variant risk for ADHD [5]. Also, the genome-wide SNP heritability estimates so far range only from 0.10 to 0.28 [24, 25]. These results account for approximately one third of ADHD's heritability as estimated by family studies [6] and suggests that ADHD genetic architecture is highly polygenic. Thus, there are so many possible combinations of allele sets that each individual patient is likely to have a unique combination. The effect size of each allele in studies designed to detect associated loci is measured across the context of an

**Table 2** Effects estimated and heterogeneity results between *ADGRL3* polymorphisms and ADHD risk.

Polymorphisms	Reference allele	Alternative allele	Frequency of reference allele	Weight	Results		Q-statistics	
					Z score	p value	$\chi^2$	p value
<b>Adults and children</b>								
rs6551665	A	G	0.6234	51523	-0.481	0.6306	61.42	<b>1.38E-02</b>
rs1974274	A	C	0.6113	49993	-0.196	0.8443	42.88	<b>0.0021</b>
rs1974275	T	C	0.1997	49622	0.473	0.6360	25.87	0.1338
rs2345039	C	G	0.4284	49651	1.012	0.3114	38.87	<b>0.0069</b>
<b>Children (<i>n</i> = 8724/14,644 cases/controls and 1893 families)</b>								
rs6551665	A	G	0.6316	29997	-2.701	<b>0.0069</b>	38.31	<b>0.0005</b>
rs1974274	A	C	0.6143	28467	-2.033	0.0421	23.04	<b>0.0274</b>
rs1974275	T	C	0.1992	28096	2.339	0.0978	17.66	0.0899
rs2345039	C	G	0.4214	28125	3.806	<b>0.0026</b>	23.06	<b>0.0272</b>
<b>Adults (<i>n</i> = 6532 cases/15,874 controls)</b>								
rs6551665	A	G	0.6128	22406	2.005	0.0450	15.94	<b>0.0433</b>
rs1974274	A	C	0.6084	22406	2.179	0.0293	15.17	0.0558
rs1974275	T	C	0.2001	22406	-0.822	0.4109	7.75	0.4582
rs2345039	C	G	0.4384	22406	-1.544	0.1226	8.08	0.4260

Statistically significant *p*-values are in bold.



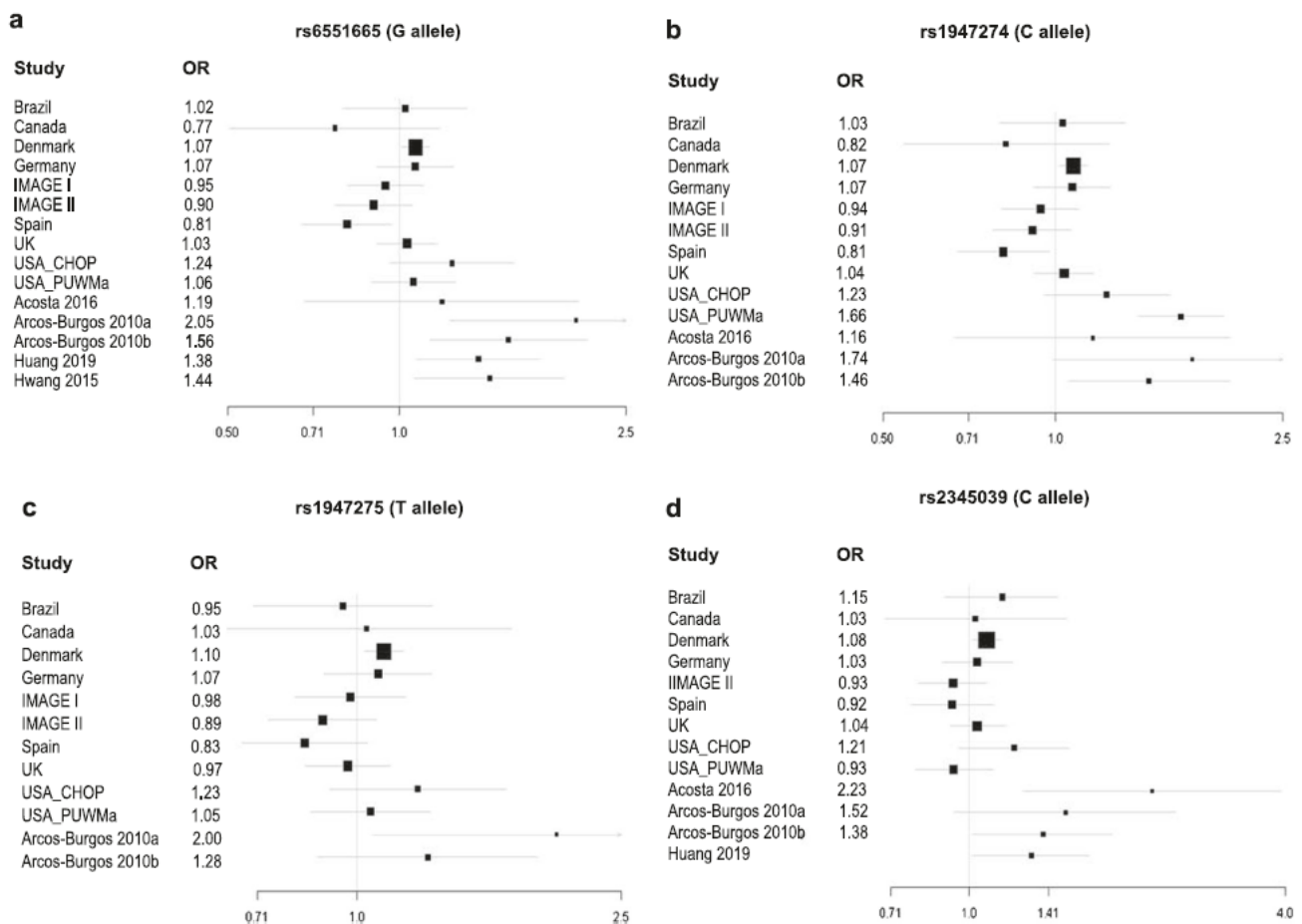
**Fig. 2** Forest plots showing the association analysis of *ADGRL3* SNPs. **a** rs6551665, **b** 1947274, **c** 1947275, and **d** 2345039 with ADHD risk in the childhood samples. Results of individual and

summary OR estimates, 95% CI, and weights of each study were shown. Horizontal lines represent 95% CI.

**Table 2** Effects estimated and heterogeneity results between *ADGRL3* polymorphisms and ADHD risk.

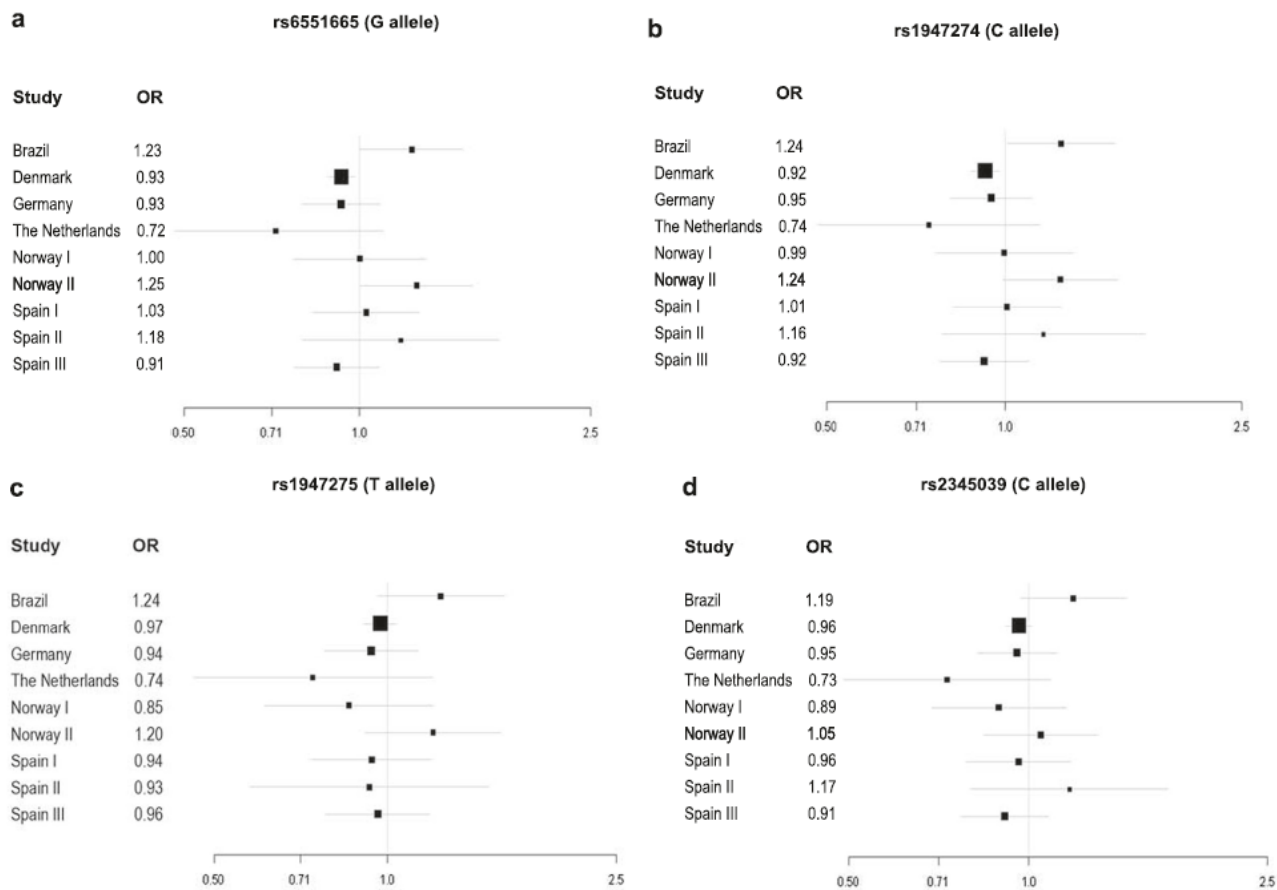
Polymorphisms	Reference allele	Alternative allele	Frequency of reference allele	Weight	Results		Q-statistics	
					Z score	p value	$\chi^2$	p value
<b>Adults and children</b>								
rs6551665	A	G	0.6234	51523	-0.481	0.6306	61.42	<b>1.38E-02</b>
rs1974274	A	C	0.6113	49993	-0.196	0.8443	42.88	<b>0.0021</b>
rs1974275	T	C	0.1997	49622	0.473	0.6360	25.87	0.1338
rs2345039	C	G	0.4284	49651	1.012	0.3114	38.87	<b>0.0069</b>
<b>Children (n = 8724/14,644 cases/controls and 1893 families)</b>								
rs6551665	A	G	0.6316	29997	-2.701	<b>0.0069</b>	38.31	<b>0.0005</b>
rs1974274	A	C	0.6143	28467	-2.033	0.0421	23.04	<b>0.0274</b>
rs1974275	T	C	0.1992	28096	2.339	0.0978	17.66	0.0899
rs2345039	C	G	0.4214	28125	3.806	<b>0.0026</b>	23.06	<b>0.0272</b>
<b>Adults (n = 6532 cases/15,874 controls)</b>								
rs6551665	A	G	0.6128	22406	2.005	0.0450	15.94	<b>0.0433</b>
rs1974274	A	C	0.6084	22406	2.179	0.0293	15.17	0.0558
rs1974275	T	C	0.2001	22406	-0.822	0.4109	7.75	0.4582
rs2345039	C	G	0.4384	22406	-1.544	0.1226	8.08	0.4260

Statistically significant p-values are in bold.



**Fig. 2** Forest plots showing the association analysis of *ADGRL3* SNPs. **a** rs6551665, **b** 1947274, **c** 1947275, and **d** 2345039 with ADHD risk in the childhood samples. Results of individual and

summary OR estimates, 95% CI, and weights of each study were shown. Horizontal lines represent 95% CI.



**Fig. 3** Forest plots showing the association analysis of *ADGRL3* SNPs. **a** rs6551665, **b** 1947274, **c** 1947275, and **d** 2345039 with ADHD risk in the adults samples. Results of individual and summary

OR estimates, 95% CI, and weights of each study were shown. Horizontal lines represent 95% CI.

averaged background, and the effect size of each locus is found to be small [26]. Therefore, the heritability that cannot be explained by main effects of rare or common variants may be possibly explained by gene–gene interactions, gene–environment interactions, or gene–environment correlations [6]. For *ADGRL3*, it is already known that gene–environment and gene–gene interactions exist. For example, a study showed that *ADGRL3* SNPs are associated with ADHD, behavioral, and cognitive dimensions in children whose mothers were exposed to minimal stress during pregnancy [27]. The interaction between the presence of the *ADGRL3* risk allele and a haplotype spanning the *NCAMI*, *TTC12*, *ANKK1*, and *DRD2* genes, a region known as the NTAD gene cluster, increased in more than twofold the risk of ADHD, influenced methylphenidate treatment response [28], and predicted symptom severity in patients with the disorder [29]. This gene–gene interaction effect on ADHD susceptibility has been replicated [11]. Corroborating these results, another study reported that the presence of risk alleles in the *ADGRL3*–*TTC12* interaction was associated with the maintenance of hyperactivity/impulsivity and combined symptoms in adult ADHD in a 7-year follow-up [12]. Thus, gene–environment and

gene–gene interactions involving *ADGRL3* may explain part of the discordant results between the present study and the GWAS meta-analysis and potentially also between ADHD in children and adults. Finally, when checking the results for *ADGRL3* in the gene-based analyses from Rovira et al. [19] in children and adults separately, we found that this gene only showed nominal association for ADHD in childhood. Although only two of the SNPs were significantly associated with ADHD, our findings support the hypothesis that the *ADGRL3* region might be important for childhood ADHD susceptibility.

The hypothesis referred to as the “omnigenic model of complex traits” by Boyle et al. [30] proposes the existence of a modest number of genes or gene pathways (core genes) with interpretable roles in disease along with “peripheral genes” regulating the core genes [30]. Probably, the top hits from GWAS have helped to pinpoint important core genes and any variant that affects expression of a peripheral gene is likely to have nonzero effects on regulation of the core genes, and thereby incur a small effect on disease risk. Essentially, because the total set of expressed genes may outnumber core genes by 100:1 or more, the sum of small effects across peripheral genes can far exceed the genetic

contribution of variants directly affecting the core genes themselves [30].

This study should be viewed in the light of certain limitations, some of them already cited above. Additional to those, different studies analyzed different haplotypes and some studies performed only independent analyses for each SNP. So, we could not perform haplotype analyses. Moreover, the METAL software does not permit us to model covariates directly (such as age, sex, and ethnicity). Consequently, to control for age, we decided to separate analyses for child and adult ADHD subjects. Although not all of the samples assessed herein are Caucasian, we did not control for ethnicity. In addition, some of the adult samples included in this meta-analysis did not follow cases with ADHD since childhood. Thus, our adult sample might include cases with both persistent ADHD and late-onset ADHD. Three previous studies revealed that a polygenic risk score predicts only child-onset and not late-onset ADHD, raising the possibility that genetic susceptibility may be different between them [31, 32].

Despite these limitations, our results demonstrate association between *ADGRL3* and ADHD, especially in childhood. This association was present across multiple studies and is compatible with our understanding of the role that the *ADGRL3* gene has in neurodevelopment. Future studies should focus on more accurate measures of brain structure and function along with much more genomic, transcriptomic, and epigenomic data to unravel the genetics of ADHD [6]. Examining multiple variants simultaneously could provide us with a way of examining the effects of these variants in behavior and physiology changes naturally seen in ADHD [23].

**Acknowledgements** The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos—Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA, Brazil) for financial support. The authors also thank Han Jun Jin from the Department of Nanobiomedical Science, Dankook University in South Korea for the provided clarifications.

**Author contributions** EMB, GCAM, CRMM, LAR, and MHH conceived and designed the study. MK, BF, MR, DBK, NRM, EHG, CHDB, and MAB contributed with data. EMB, GCAM, CRMM, PR, and TPQ conducted statistical analyses and wrote the first draft of the manuscript. PR provided SNP-based and gene-based results for *ADGRL3* on ADHD in children and on persistent ADHD in adults from their GWAS-MA [19]. LAR and MHH provided funding for the project. All coauthors provided critical feedback on the manuscript, suggested additional analyses, and critical revisions, and edited the manuscript for clarity and precision. All authors contributed to and have approved the final manuscript.

### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** CRMM receives financial research support from the government agency: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). CRMM received fees for the

development of educational materials for Libbs, Novartis, and Pfizer. He has served as a consultant and served on the speakers' bureau of Shire. Libbs, Novartis, and Shire make products for the treatment of ADHD. CRMM received travel, accommodation, and registration support to the fourth and fifth World Congress on ADHD from the World Federation of ADHD. EHG was on the speaker's bureau for Novartis and Shire, and Shire's national and international advisory boards for the last 3 years. He also received travel awards (air tickets and hotel accommodations) for participating in two psychiatric meetings from Shire and Novartis. LAR has received grant or research support from, served as a consultant to, and served on the speakers' bureau of Eli Lilly and Co., Janssen, Medice, Novartis and Shire. The ADHD and Juvenile Bipolar Disorder Outpatient Programs chaired by LAR have received unrestricted educational and research support from the following pharmaceutical companies: Eli Lilly and Co., Janssen, Novartis, and Shire. LAR has received authorship royalties from Oxford Press and ArtMed and travel grants from Shire to take part in the 2018 APA and from Novartis to take part of the 2015 WFADHD congresses. MHH receives financial research support from the Brazilian governmental agency: CNPq. EMB and GCAM have received financial research support from CNPq. CHDB and DBK have received financial support from the following Brazilian agencies: CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and HCPA (FIPE-HCPA). BF has received educational speaking fees from Shire and Medice. She also is supported by the personal Vici grant from the Netherlands Organisation for Scientific Research (NWO). PR is a recipient of a predoctoral fellowship from the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca, Generalitat de Catalunya, Spain (2016FI\_B 00899). TPQ, MK, MR, NRM, and MAB have no competing interests.

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

### References

1. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5th ed. Arlington, VA: American Psychiatric Publishing; 2013.
2. Polanczyk GV, Salum GA, Sugaya LS, Caye A, Rohde LA. Annual research review: a meta-analysis of the worldwide prevalence of mental disorders in children and adolescents. *J Child Psychol Psychiatry*. 2015;56:345–65.
3. Simon V, Czobor P, Bálint S, Mészáros A, Bitter I. Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis. *Br J Psychiatry*. 2009;194:204–11.
4. Asherson P, Trzaskowski M. Attention-deficit/hyperactivity disorder is the extreme and impairing tail of a continuum. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2015;54:249–50.
5. Demontis D, Walters RK, Martin J, Mattheisen M, Als TD, Agerbo E, et al. Discovery of the first genome-wide significant risk loci for ADHD. *Nat Genet*. 2019;51:63–75.
6. Faraone SV, Larsson H. Genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*. 2019;24:562–75.
7. Akutagawa-Martins GC, Rohde LA, Hutz MH. Genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: an update. *Expert Rev Neurother*. 2016;16:145–56.
8. Arcos-Burgos M, Jain M, Acosta MT, Shively S, Stanescu H, Wallis D, et al. A common variant of the latrophilin 3 gene, *LPHN3*, confers susceptibility to ADHD and predicts effectiveness of stimulant medication. *Mol Psychiatry*. 2010;15:1053–66.
9. Hwang IW, Lim MH, Kwon HJ, Jin HJ. Association of *LPHN3* rs6551665 A/G polymorphism with attention deficit and hyperactivity disorder in Korean children. *Gene*. 2015;566:68–73.



10. Ribasés M, Ramos-Quiroga JA, Sánchez-Mora C, Bosch R, Richarte V, Palomar G, et al. Contribution of LPHN3 to the genetic susceptibility to ADHD in adulthood: a replication study. *Genes, Brain Behav.* 2011;10:149–57.
11. Bruxel EM, Salatino-Oliveira A, Akutagava-Martins GC, Tovo-Rodrigues L, Genro JP, Zeni CP, et al. LPHN3 and attention-deficit/hyperactivity disorder: a susceptibility and pharmacogenetic study. *Genes, Brain Behav.* 2015;14:419–27.
12. Kappel DB, Schuch JB, Rovaris DL, da Silva BS, Cupertino RB, Winkler C, et al. Further replication of the synergistic interaction between LPHN3 and the NTAD gene cluster on ADHD and its clinical course throughout adulthood. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry.* 2017;79:120–7.
13. Huang X, Zhang Q, Gu X, Hou Y, Wang M, Chen X, et al. LPHN3 gene variations and susceptibility to ADHD in Chinese Han population: a two-stage case-control association study and gene-environment interactions. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2019;28:861–73.
14. Lange M, Norton W, Coolen M, Chaminade M, Merker S, Proft F, et al. The ADHD-susceptibility gene *lphn3.1* modulates dopaminergic neuron formation and locomotor activity during zebrafish development. *Mol Psychiatry.* 2012;17:946–54.
15. Wallis D, Hill DS, Mendez IA, Abbott LC, Finnell RH, Wellman PJ, et al. Initial characterization of mice null for *Lphn3*, a gene implicated in ADHD and addiction. *Brain Res.* 2012;1463:85–92.
16. O'Sullivan ML, Martini F, von Daake S, Comoletti D, Ghosh A. LPHN3, a presynaptic adhesion-GPCR implicated in ADHD, regulates the strength of neocortical layer 2/3 synaptic input to layer 5. *Neural Dev.* 2014;9:1–11.
17. Orsini CA, Setlow B, DeJesus M, Galaviz S, Loesch K, Ioerger T, et al. Behavioral and transcriptomic profiling of mice null for *Lphn3*, a gene implicated in ADHD and addiction. *Mol Genet Genom Med.* 2016;4:322–43.
18. Martinez AF, Abe Y, Hong S, Molyneux K, Yarnell D, Löhr H, et al. An ultraconserved brain-specific enhancer within *ADGRL3* (*LPHN3*) underpins attention-deficit/hyperactivity disorder susceptibility. *Biol Psychiatry.* 2016;80:943–54.
19. Rovira P, Demontis D, Sanchez-Mora C, Zayats T, Klein M, Roth Mota N, et al. Shared genetic background between children and adults with attention deficit/hyperactivity disorder. 2019. <https://doi.org/10.1101/589614>.
20. Willer CJ, Li Y, Abecasis GR. METAL: fast and efficient meta-analysis of genomewide association scans. *Bioinformatics.* 2010;26:2190–1.
21. Higgins JPT, Green S (editors). *Cochrane handbook for systematic reviews of interventions* version 5.1.0 [updated March 2011]. The Cochrane Collaboration; 2011. [www.handbook.cochrane.org](http://www.handbook.cochrane.org).
22. Acosta MT, Swanson J, Stehli A, Molina BSG, Martinez AF, Arcos-Burgos M, et al. *ADGRL3* (*LPHN3*) variants are associated with a refined phenotype of ADHD in the MTA study. *Mol Genet Genom Med.* 2016;4:540–7.
23. Dark C, Homman-Ludiye J, Bryson-Richardson RJ. The role of ADHD associated genes in neurodevelopment. *Dev Biol.* 2018; 438:69–83.
24. The Brainstorm Consortium, Anttila V, Bulik-Sullivan B, Finucane HK, Walters R, Bras J, et al. Analysis of shared heritability in common disorders of the brain. *Science.* 2018;360:eaap8757. <https://doi.org/10.1126/science.aap8757>.
25. Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics C. Genetic relationship between five psychiatric disorders estimated from genome-wide SNPs. *Nat Genet.* 2013;45:984–94.
26. Visscher PM, Wray NR, Zhang Q, Sklar P, McCarthy MI, Brown MA, et al. 10 years of GWAS discovery: biology, function, and translation. *Am J Hum Genet.* 2017;101:5–22.
27. Choudhry Z, Sengupta SM, Grizenko N, Fortier ME, Thakur GA, Bellingham J, et al. LPHN3 and attention-deficit/hyperactivity disorder: Interaction with maternal stress during pregnancy. *J Child Psychol Psychiatry Allied Discip.* 2012; 53:892–902.
28. Jain M, Vélez JI, Acosta MT, Palacio LG, Balog J, Roessler E, et al. A cooperative interaction between LPHN3 and 11q doubles the risk for ADHD. *Mol Psychiatry.* 2012;17:741–7.
29. Acosta MT, Vélez JI, Bustamante ML, Balog JZ, Arcos-Burgos M, Muenke M. A two-locus genetic interaction between LPHN3 and 11q predicts ADHD severity and long-term outcome. *Transl Psychiatry.* 2011;1:1–8.
30. Boyle EA, Li YI, Pritchard JK. An expanded view of complex traits: from polygenic to omnigenic. *Cell.* 2017;169:1177–86.
31. Moffitt TE, Houts R, Asherson P, Belsky DW, Corcoran DL, Hammerle M, et al. Is adult ADHD a childhood-onset neurodevelopmental disorder? Evidence from a four-decade longitudinal cohort study. *Am J Psychiatry.* 2015;172:967–77.
32. Riglin L, Collishaw S, Thapar AK, Dalgaard S, Langley K, Smith GD, et al. Association of genetic risk variants with attention-deficit/hyperactivity disorder trajectories in the general population. *JAMA Psychiatry.* 2016;73:1285.

## Affiliations

E. M. Bruxel<sup>1,2</sup> · C. R. Moreira-Maia<sup>2</sup> · G. C. Akutagava-Martins<sup>1,2,3</sup> · T. P. Quinn<sup>4</sup> · M. Klein<sup>5,6</sup> · B. Franke<sup>5,7</sup> · M. Ribasés<sup>8,9,10,11</sup> · P. Rovira<sup>8,10</sup> · C. Sánchez-Mora<sup>8,9,10,11</sup> · D. B. Kappel<sup>1,12</sup> · N. R. Mota<sup>5,7,12</sup> · E. H. Grevet<sup>12,13</sup> · C. H. D. Bau<sup>1,12</sup> · M. Arcos-Burgos<sup>14</sup> · L. A. Rohde<sup>2,15</sup> · M. H. Hutz<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil

<sup>2</sup> ADHD Outpatient Program (PRODAH) and Developmental Psychiatry Program, Child and Adolescent Psychiatry Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup> College of Medicine, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Brazil

<sup>4</sup> Bioinformatics Core Research Group, Deakin University,

Geelong, VIC, Australia

<sup>5</sup> Department of Human Genetics, Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands

<sup>6</sup> Department of Psychiatry, Brain Center Rudolf Magnus, University Medical Center Utrecht, Utrecht, The Netherlands

<sup>7</sup> Department of Psychiatry, Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands

- <sup>8</sup> Psychiatric Genetics Unit, Group of Psychiatry, Mental Health and Addiction, Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain
- <sup>9</sup> Biomedical Network Research Centre on Mental Health (CIBERSAM), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain
- <sup>10</sup> Department of Psychiatry, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain
- <sup>11</sup> Department of Psychiatry and Legal Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain
- <sup>12</sup> ADHD Outpatient Program (PRODAH - A), Adult Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
- <sup>13</sup> Department of Psychiatry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
- <sup>14</sup> Grupo de Investigación en Psiquiatría (GIPSI), Instituto de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
- <sup>15</sup> National Institute of Developmental Psychiatry for Children and Adolescents, Porto Alegre, Brazil

# Produção Científica Adicional



“How do you write like tomorrow won't arrive?  
How do you write like you need it to survive?  
How do you write every second you're alive?”

Lin-Manuel Miranda  
In: Hamilton – Non-stop



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



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

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

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

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

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

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

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

### KEYWORDS

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

### Abstract

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

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

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

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



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

European Psychiatry

journal homepage: <http://www.europsy-journal.com>



Commentary

Commentary on “Neuropsychological deficits in adults age 60 and above with attention deficit hyperactivity disorder”





Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Psychiatric Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/psychires](http://www.elsevier.com/locate/psychires)



## Evidence of sexual dimorphism of *HTR1B* gene on major adult ADHD comorbidities



Diana Müller<sup>a, b</sup>, Eugenio H. Grevet<sup>b, c</sup>, Alana C. Panzenhagen<sup>a, b</sup>, Renata B. Cupertino<sup>a, b</sup>, Bruna S. da Silva<sup>a, b</sup>, Djenifer B. Kappel<sup>a, b</sup>, Nina R. Mota<sup>b, d, e</sup>, Paula Blaya-Rocha<sup>b</sup>, Stefania P. Teche<sup>b</sup>, Eduardo S. Vitola<sup>b</sup>, Luis A. Rohde<sup>b, c</sup>, Verônica Contini<sup>f</sup>, Diego L. Rovaris<sup>a, b</sup>, Jaqueline B. Schuch<sup>a, b, 1</sup>, Claiton H.D. Bau<sup>a, b, \*, 1</sup>

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

<sup>b</sup> ADHD Outpatient Program, Adult Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>c</sup> Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>d</sup> Department of Human Genetics, Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands

<sup>e</sup> Department of Psychiatry, Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands

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

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 30 May 2017

Received in revised form

7 August 2017

Accepted 7 September 2017

#### Keywords:

Attention-deficit/hyperactivity disorder

Serotonin receptor 1B

Sexual dimorphism

Comorbidity

Psychiatric disorder

### ABSTRACT

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

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

ORIGINAL ARTICLE

## Exocytosis-related genes and response to methylphenidate treatment in adults with ADHD


BS da Silva<sup>1</sup>, RB Cupertino<sup>1</sup>, DL Rovaris<sup>1</sup>, JB Schuch<sup>1</sup>, DB Kappel<sup>1</sup>, D Müller<sup>1</sup>, CE Bandeira<sup>1</sup>, MM Victor<sup>2</sup>, RG Karam<sup>2</sup>, NR Mota<sup>1,3</sup>, LA Rohde<sup>2,4</sup>, V Contini<sup>5</sup>, EH Grevet<sup>2,4</sup> and CHD Bau<sup>1,2</sup>

Experimental studies have demonstrated that methylphenidate (MPH) modulates the synaptic vesicle trafficking and synaptotagmin-1 (Syt1) mRNA levels. Syt1 is a regulatory protein of the SNARE complex, a neurotransmitter exocytosis mediator. Despite this evidence, most SNARE complex-related genes have never been evaluated in attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) pharmacogenetics. This study evaluates, for the first time, polymorphisms on the SNARE complex-related genes *STX1A* (rs2228607), *VAMP2* (26bp Ins/Del) and *SYT1* (rs1880867 and rs2251214) on the response to immediate-release methylphenidate (IR-MPH) in a naturalistic sample of adults with ADHD. The sample comprised 433 subjects, of which 272 (62.8%) have completed the short-term IR-MPH treatment (at least 30 days). The main outcome measure was the categorical variable of short-term response to IR-MPH based on the Swanson, Nolan and Pelham Rating Scale version 4 (SNAP-IV), and on the clinical global impression-improvement scale. Additional analyses evaluated the percentage of SNAP-IV symptom reduction for each dimension as well as short- and long- (7 years) term treatment persistence. *SYT1*-rs2251214 was associated with the categorical short-term response to IR-MPH ( $P=0.006$ ,  $P_{FDR}=0.028$ ), and with the percentage of inattention and oppositional defiant disorder symptoms reduction ( $P=0.007$ ,  $P_{FDR}=0.028$  and  $P=0.017$ ,  $P_{FDR}=0.048$ , respectively). *SYT1*-rs2251214 was also associated with short-term treatment persistence ( $P=0.018$ ,  $P_{FDR}=0.048$ ), and with months of treatment ( $P=0.002$ ,  $P_{FDR}=0.016$ ) in the long-term protocol. Our findings suggest that *SYT1*-rs2251214 presents a broad influence in IR-MPH response variability in adults with ADHD, being involved with both symptom response and treatment persistence. If such findings are replicated, Syt1 could represent a key element in MPH pharmacodynamics in adults with ADHD.

*Molecular Psychiatry* (2018) **23**, 1446–1452; doi:10.1038/mp.2017.90; published online 2 May 2017



## Evidence for Association Between *OXTR* Gene and ASD Clinical Phenotypes

Lucas de Oliveira Pereira Ribeiro<sup>1</sup> · Pedro Vargas-Pinilla<sup>2</sup> · Djenifer B. Kappel<sup>2</sup> · Danae Longo<sup>2</sup> · Josiane Ranzan<sup>3</sup> · Michele Michelin Becker<sup>3</sup> · Rudimar dos Santos Riesgo<sup>3</sup> · Lavinia Schuler-Faccini<sup>2</sup> · Tatiana Roman<sup>2</sup> · Jaqueline Bohrer Schuch<sup>2,4</sup> 

Received: 10 July 2017 / Accepted: 11 May 2018 / Published online: 1 June 2018  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

### Abstract

Autism spectrum disorder (ASD) is an early-onset neurodevelopmental disorder characterized by impairments in social behaviors and communication. Oxytocin and its signaling pathway are related to a range of human behaviors, from facial expression recognition to aggressive behaviors, and have been suggested as involved in the etiology of ASD. Our aim was to evaluate the influence of two polymorphisms (rs1042778, rs53576) at the oxytocin receptor gene (*OXTR*) on ASD diagnosis and on specific ASD-related clinical symptoms (seizures, panic, and aggressive behaviors). We also assessed if these SNPs could be related to changes in *OXTR* availability and functionality using a bioinformatic approach. The sample was composed by 209 probands with ASD and their biological parents. Family-based approach and logistic regression models were used to investigate the outcomes. We observed that panic and aggressive behaviors were nominally associated with presence of rs1042778 T allele ( $P = 0.019/P_{\text{corr}} = 0.114$ ;  $P = 0.046/P_{\text{corr}} = 0.276$  respectively). Also, in the family-based analysis, a trend towards association with ASD susceptibility was observed for rs1042778 (G allele) ( $P = 0.066$ ). In a bioinformatic approach, we demonstrated that rs1042778 G allele is determinant for the binding of the transcription factor MAZ, suggesting that when the T allele is present, the absence of MAZ binding might be associated with lower transcription levels of the *OXTR* gene. The overall findings suggest that the *OXTR* gene may play a role in ASD diagnosis and some of its clinical phenotypes, supported by previous animal and clinical studies. Further investigations are necessary to replicate our findings and fully understand the effects of the oxytocin pathway on ASD.

**Keywords** Autism · Oxytocin receptor gene · Panic · Aggressive · Oxytocin · Endophenotype





Viewpoint

ANZJP

## Attention-deficit hyperactivity disorder in ancient Greece: The Obtuse Man of Theophrastus

*Australian & New Zealand Journal of Psychiatry*  
2018, Vol. 52(6) 509–513  
DOI: 10.1177/0004867418769743

© The Royal Australian and  
New Zealand College of Psychiatrists 2018  
Reprints and permissions:  
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav  
journals.sagepub.com/home/anp



Marcelo M Victor<sup>1</sup>, Bruna S da Silva<sup>1,2</sup>, Djenifer B Kappel<sup>1,2</sup>,  
Claiton HD Bau<sup>1,2</sup> and Eugenio H Grevet<sup>1,3</sup>

### Abstract

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

### Keywords

Attention-deficit hyperactivity disorder, history of attention-deficit hyperactivity disorder, adult attention-deficit hyperactivity disorder



Contents lists available at ScienceDirect

Progress in Neuropsychopharmacology  
& Biological Psychiatry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/psnp](http://www.elsevier.com/locate/psnp)



The association between *SYT1*-rs2251214 and cocaine use disorder further supports its role in psychiatry



Bruna S. da Silva<sup>a,b,1</sup>, Renata B. Cupertino<sup>a,b,1</sup>, Jaqueline B. Schuch<sup>c,d</sup>, Djenifer B. Kappel<sup>a,b</sup>, Breno Sanvicente-Vieira<sup>e</sup>, Cibele E. Bandeira<sup>a,b</sup>, Lisia von Diemen<sup>d</sup>, Felix H.P. Kessler<sup>d</sup>, Eugenio H. Grevet<sup>b,f</sup>, Rodrigo Grassi-Oliveira<sup>e</sup>, Claiton H.D. Bau<sup>a,b</sup>, Diego L. Rovaris<sup>b,f,\*</sup>

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

<sup>b</sup> ADHD Outpatient Program, Adult Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Immunosenescence, Graduate Program in Biomedical Gerontology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>d</sup> Center for Drug and Alcohol Research, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>e</sup> Developmental Cognitive Neuroscience Lab, Biomedical Research Institute, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil,

<sup>f</sup> Department of Psychiatry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

SNARE complex  
Cocaine  
Addiction  
Substance use disorders  
Stimulants

ABSTRACT

Synaptotagmin-1 is an essential regulator of synaptic vesicle exocytosis, and its encoding gene (*SYT1*) is a genome and transcriptome-wide association hit in cognitive performance, personality and cocaine use disorder (CUD) studies. Additionally, in candidate gene studies the specific variant rs2251214 has been associated with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD), antisocial personality disorder and other externalizing phenotypes in adults with ADHD, as well as with response to methylphenidate (MPH) treatment. In this context, we sought to evaluate, in an independent sample, the association of this variant with CUD, a phenotype that shares common biological underpinnings with the previously associated traits. We tested the association between *SYT1*-rs2251214 and CUD susceptibility and severity (addiction severity index) in a sample composed by 315 patients addicted to smoked cocaine and 769 non-addicted volunteers. *SYT1*-rs2251214 was significantly associated with susceptibility to CUD, where the G allele presented increased risk for the disorder in the genetic models tested ( $P = 0.0021$ , OR = 1.44, allelic;  $P = 0.0012$ , OR = 1.48, additive;  $P = 0.0127$ , OR = 1.41, dominant). This is the same allele that was associated with increased risk for ADHD and other externalizing behaviors, as well as poor response to MPH treatment in previous studies. These findings suggest that the neurotransmitter exocytosis pathway might play a critical role in the liability for psychiatric disorders, especially externalizing behaviors and CUD.

# Anexos



## Aprovação da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Hospital de Clínicas de Porto Alegre



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

### COMISSÃO CIENTÍFICA

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

**Projeto:** 160600

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

**Pesquisadores:**

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

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

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

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

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

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

Porto Alegre, 03 de janeiro de 2017.

Prof. José Roberto Goldim  
Coordenador CEP/HCPA