

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

A influência do gene *FOXP2* sobre o Transtorno de Deficit de Atenção/Hiperatividade e
fenótipos relacionados em uma abordagem *gene-wide*

GABRIELA PESSIN MEYER

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

Orientador: Prof. Dr Claiton Henrique Dotto Bau

Co-orientadora: Dra Bruna Santos da Silva

Porto Alegre

2020

Instituições e fontes financiadoras

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

Instituições Financiadoras:

CNPq

CAPES

FAPERGS

FIPE-HCPA

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao PPGBM por me receber, principalmente ao Elmo, pela paciência e simpatia. Meus agradecimentos ao meu orientador Claiton pela disponibilidade e por me ensinar a importância das frases curtas, ainda que, muitas vezes eu não consiga botar em prática. A minha coorientadora Bruna, também pela paciência nas muitas vezes em que precisei de apoio técnico e emocional com as análises. A todas as colegas da matilha pelo apoio e também por me receberem como parte da família, Diana, Cibele, Duda, Renata, Djeni, Jaque e aos queridos ICs muito obrigada por ajudarem nas extrações de DNA e pelas conversas sobre o futuro. Aprendi muito com vocês durante esses dois anos, com certeza eu saio bem diferente de quando entrei e com novas perspectivas sobre a ciência. Foram grandes desafios pessoais e emocionais completar essa etapa da vida.

Gostaria de agradecer também minha família, meus pais, em especial minha mãe, Jane Pessin Meyer, pelo apoio corrigindo meus erros de português. E um agradecimento especial a minha grande amiga Dra Cristine Kaufmann, pelo tempo que passou comigo treinando minhas habilidades para as aulas e apresentações, pelas palavras carinhosas em todos os momentos em que eu precisei e pelas longas conversas sobre a ciência que acreditamos.

Quero agradecer as pessoas que lutam por uma ciência que não é educada pela indústria farmacêutica e por cientistas que com sua curiosidade e motivação visam gerar conhecimento para o povo brasileiro. Muito Obrigada.

Sumário

Lista de abreviaturas	5
Resumo	6
Abstract	7
Capítulo I: Introdução Geral	8
Caracterização do Transtorno de Deficit de Atenção/Hiperatividade	9
Características Neurocognitivas e Neuropsicológicas	10
TDAH e comorbidades psiquiátricas	12
Etiologia do TDAH	13
Gene <i>FOXP2</i>	15
Análise molecular do gene <i>FOXP2</i>	16
<i>FOXP2</i> e fenótipos do comportamento.....	18
Capítulo II: Justificativa e Objetivos	20
Justificativa.....	21
Objetivos.....	21
Objetivos Gerais.....	21
Objetivos Específicos.....	21
Capítulo III: Artigo Científico	22
<i>Gene-wide analysis of FOXP2 on ADHD and related phenotypes</i>	23
Capítulo IV: Discussão Geral	45
Discussão Geral.....	46
Referências Bibliográficas	51

Lista de abreviaturas

APA	Associação Americana de Psiquiatria
DSM-5	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais-5
<i>FOXP2</i>	Gene <i>Forkhead Box P2</i>
GWAS	Estudo de associação por varredura genômica
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
TDAH	Transtorno de Deficit de Atenção/Hiperatividade
TPAS	Transtorno de Personalidade Antissocial
TUT	Transtorno por Uso de Tabaco
TWAS	Estudo de associação de transcriptoma tecido-específico
SNAP-IV	Escala Swanson, Nolan e Pelham- IV

Resumo

O Transtorno de Deficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) é um dos diagnósticos psiquiátricos mais prevalentes do mundo, sendo que nas últimas décadas as pesquisas se intensificaram na intenção de entender sua neurobiologia. A união de pesquisadores de várias partes do mundo promoveu um grande estudo de associação por varredura genômica (GWAS) que evidenciou 12 loci associados ao TDAH. Um deles é a região onde se encontra o gene *FOXP2*, gene que é amplamente estudado em suas implicações médicas e evolutivas no desenvolvimento da linguagem e comunicação mais sofisticada em seres humanos. O *FOXP2* também está associado por GWAS a outros fenótipos como neuroticismo e problemas com sono. O objetivo deste estudo foi avaliar o papel do *FOXP2* no TDAH, considerando sua heterogeneidade fenotípica. Participaram do estudo 407 adultos atendidos no Programa de Transtorno de Deficit de Atenção/Hiperatividade no Hospital de Clínicas em Porto Alegre/RS, e 463 controles doadores de sangue do mesmo hospital. O diagnóstico do TDAH e comorbidades foi realizado segundo os critérios do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), sendo a avaliação de gravidade dos sintomas realizada pelo questionário Swanson, Nolan e Pelham (SNAP-IV). A avaliação de temperamento e personalidade foi realizada com o Inventário de Temperamento e Caráter (TCI). A genotipagem foi executada pela plataforma Infinium PsychArray-24 BeadChip, sendo os resultados analisados pelo software PLINK 1.9. 311 variantes genéticas do *FOXP2* foram avaliadas pela abordagem *gene-wide*. Os resultados apontaram para associações entre o *FOXP2* e medidas de evitação de dano, hiperatividade e transtorno por uso de tabaco. Variantes independentes apresentaram associações significativas, destacando-se o alelo de inserção da variante rs79622555 com o transtorno de personalidade antisocial, escores elevados em hiperatividade e procura de novidades e baixos em evitação de dano. Outros polimorfismos mostraram-se associados com transtorno por uso de tabaco e sintomas de hiperatividade. Concluindo, o conjunto de dados é consistente com estudos prévios que implicam o gene *FOXP2* com fenótipos relacionados com o TDAH, incluindo gravidade dos sintomas.

Abstract

Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) is one of the most prevalent psychiatric conditions in the world, and in recent decades the research has been intensified in order to understand its neurobiology. The joint efforts of researchers from various parts of the world promoted a large genome-wide association study (GWAS) that showed association of 12 loci with ADHD. One of them is the region where the *FOXP2* gene is located, a widely studied gene by its medical and evolutionary implications in the development of language and more sophisticated communication in human beings. *FOXP2* is also associated by GWAS with other phenotypes such as neuroticism and sleep problems. The aim of this study was to evaluate the role of *FOXP2* in ADHD, considering its phenotypic heterogeneity. The study included 407 adults ascertained in the Attention Deficit/Hyperactivity Disorder Program at Hospital de Clínicas in Porto Alegre / RS, and 463 blood donor controls from the same hospital. The diagnosis of ADHD and comorbidities was performed according to the criteria of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5), while the assessment of the symptom severity by the Swanson, Nolan and Pelham questionnaire (SNAP-IV). The temperament and personality traits were assessed using the Temperament and Character Inventory (TCI). Genotyping was performed by the Infinium PsychArray-24 BeadChip platform, and the association analysis by PLINK 1.9 software. 311 genetic variants of *FOXP2* were evaluated in a gene-wide approach. The results pointed to associations between *FOXP2* and measures of harm avoidance, hyperactivity and tobacco use disorder. Independent variants showed significant associations, notably the insertion allele of the variant rs79622555 with antisocial personality disorder, high scores on hyperactivity and novelty seeking and low scores on harm avoidance. Other polymorphisms were associated with tobacco use disorder and hyperactivity symptoms. In conclusion, the overall data is consistent with previous studies involving the *FOXP2* gene with ADHD-related phenotypes, including severity in symptoms.

Caracterização do Transtorno de Deficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH)

O Transtorno de Deficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) é caracterizado pelos principais sintomas: a desatenção, a impulsividade emocional e hiperatividade motora. Trata-se da condição psiquiátrica infantil mais prevalente no mundo, com prevalência estimada nesta faixa etária em 5,9 a 7.1% (Polanczyk et al., 2007; Polanczyk et al., 2014) e na fase adulta cerca de 2,5% (Simon et al., 2009).

O sexo masculino comumente apresenta sintomas na infância, com predominância de sintomas hiperativos, enquanto no sexo feminino o início dos sintomas frequentemente acontece na adolescência, com predominância de sintomas de desatenção. Na fase adulta não são observadas diferenças entre os sexos (Grevet et al., 2006; Willcutt, 2012; Williamson e Johnston, 2015; Murray et al., 2018).

O manual mais utilizado para diagnóstico de TDAH, o DSM (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*), foi proposto pela Associação Norte-Americana de Psiquiatria (APA), e, atualmente, encontra-se na quinta edição (DSM-5). Os critérios para diagnóstico são a presença de cinco ou mais sintomas de desatenção e/ou hiperatividade/impulsividade presentes antes dos 12 anos de idade e que causem prejuízo em ao menos dois diferentes contextos de vida, como ambiente familiar, escolar ou profissional. O TDAH foi acrescentado no manual em 1980, na terceira edição, o que levou a comunidade científica a se organizar para pesquisar o tema com uma visão neurobiológica. Há três apresentações reconhecidas, a predominantemente hiperativa/impulsiva, a predominantemente desatenta e a combinada (APA, 2013; Faraone et al., 2015). No manual organizado pela Organização Mundial de Saúde, ICD-11 (*International Classification Disease*), a caracterização do TDAH é similar a do DSM-5 (ICD-11).

As principais características do TDAH descritas no DSM em relação ao deficit de atenção incluem facilidade em se distrair, não terminar tarefas, tédio, falhar quando é necessária atenção nos detalhes, descuidar de pequenos enganos, não ouvir quando lhe é dirigida a palavra, frequentemente perder materiais necessários para tarefas escolares ou trabalho, e, normalmente, evitar esforço mental prolongado. As características hiperativas e impulsivas são descritas como inquietude exagerada, ficar remexendo mãos ou pés constantemente, e repetidamente, deixar o assento em situações em que

ficar sentado é o esperado, agir como se tivesse um “motor”, falar muito e rápido, constantemente interromper conversas, não conseguir esperar a sua vez de falar ou agir (Kieling e Rohde, 2010; DSM-V, 2013). Além dos principais sintomas, múltiplos atrasos de desenvolvimento são comumente encontrados em crianças com TDAH, como déficits sensoriais, motores, linguísticos e intelectuais (Yochman et al., 2006)

Classicamente caracterizado como transtorno do neurodesenvolvimento, grande parte dos estudos focam em pessoas de até 17 anos. No entanto, considerando que vários pacientes persistem com o transtorno na vida adulta, há um esforço por parte de vários pesquisadores para caracterizar o transtorno no adulto. Com o passar da idade, a hiperatividade observada nos adultos fica mais sutil, tendo como principal aspecto a dificuldade na realização de multitarefas, sendo normalmente a desatenção o principal fator relacionado ao prejuízo nos diferentes contextos de vida desses pacientes (Matte et al., 2012).

Em cerca de 50% dos casos, os sintomas podem ter remissão parcial e voltar a apresentar prejuízo, principalmente, diante uma situação de stress (Faraone et al., 2006; revisado em Franke et al., 2018). Também há evidências de que diferentes variantes genéticas estejam influenciando o transtorno em crianças e adultos, por isso é relevante que se estude em grupos separados (Franke et al., 2010). Em análises envolvendo dados de escore de risco poligênico, observou-se que TDAH na infância e TDAH persistente na vida adulta estão mais associados geneticamente entre si do que TDAH que tem início tardio. Por isso, estudos longitudinais são importantes para a avaliação dos sintomas e do desenvolvimento do transtorno ao longo do tempo (Thapar e Riglin, 2020).

Características Neurocognitivas e Neuropsicológicas

Características neurocognitivas e neuropsicológicas vem sendo analisadas como possíveis fenótipos intermediários dentro do espectro do TDAH (Pennigton, 2005).

No campo neurocognitivo, a principal teoria aborda as funções executivas, a qual se baseia em observações de lesões do córtex pré-frontal. Lesões nessa área do cérebro, normalmente, geram comportamentos de desinibição, impulsividade e alteração de estados emocionais e sociais (Stuss et al., 1992). A origem dos sintomas do TDAH

estaria na falha do sistema de controle inibitório que, por consequência, altera quatro funções executivas, sendo elas a memória de trabalho (análise e síntese de informações e capacidade de segurar eventos na mente em uma sequência temporal), a internalização verbal (construção de um discurso coerente), a autorregulação emocional e motivacional (aprendizado do autocontrole), e, por último, a reconstrução (reavaliação e ações corretivas) (Barkley, 1997). Os principais domínios que afetam o TDAH, segundo estudos de meta-análise, indicam crianças e adultos com baixos escores em testes que medem desinibição, memória de trabalho, planejamento, vigilância e alta associação com variabilidade de tempo de reação, uma medida que capta lapsos de atenção (Wilcutt et al., 2005; Frazier-Wood et al., 2012; Huang-Pollock et al., 2012; Coghill et al., 2014; Karalunas et al., 2014; Pievsky e McGrath, 2018). Apesar de os testes neurocognitivos não serem utilizados como padrão dos critérios diagnósticos eles aumentam significativamente a acurácia da avaliação clínica (Nikolas et al., 2019).

Em relação à neuropsicologia são avaliadas características de temperamento/personalidade que são relacionadas às questões emocionais. Traços de temperamento são descritos como um grupo de comportamentos e tendências emocionais negativas e positivas, que são baseadas nas percepções de si e de outros (Cloninger et al., 1993). O TDAH tem associações com três dimensões de temperamento, sendo que os sintomas de desatenção estão relacionados com baixa pontuação com medidas de conscienciosidade e maior grau de neuroticismo, sintomas de hiperatividade/impulsividade e sintomas de oposição desafiante estão relacionadas com baixa pontuação em agradabilidade (Nigg et al., 2002; Gomez e Corr, 2014).

Na avaliação da personalidade, quatro medidas são consideradas moderadamente herdáveis e estáveis durante a vida: evitação de dano, procura por novidade, dependência de recompensa e persistência (Cloninger et al., 1993). No TDAH em adultos há a associação de altos escores de procura por novidades, que se caracterizam por facilidade em se entediar, impulsividade, extravagância e mudanças bruscas de humor. Altos escores de evitação de dano, que se caracterizam por medo excessivo, inibição social, timidez, passividade e pessimismo. Baixos escores de dependência de recompensa, que se caracterizam por insensibilidade social e indiferença e baixos escores de persistência, que se caracterizam pela facilidade de desistir quando há frustração. Já altos escores de procura por novidades em combinação com baixos escores

de evitação de dano estão associados a sintomas de hiperatividade equanto que altos escores de evitação de dano estão associados com desatenção (Faraone et al., 2009; Salgado et al., 2009). É também proposto que a desregulação emocional seja incluída como um dos elementos de avaliação do TDAH, principalmente em relação à irritabilidade (Karalunas et al., 2019a; Karalunas e Nigg, 2019b; Nigg et al., 2020).

Como se pode observar, o TDAH apresenta uma alta heterogeneidade e há esforços em caracterizar fenótipos além do escopo formal dos critérios diagnósticos. Há estudos que analisam características cognitivas interagindo com características de temperamento/personalidade e observa-se prejuízo correlacionado entre estes grupos, no entanto no TDAH ainda são necessários maiores estudos (Van Dijk et al., 2017).

TDAH e Comorbidades psiquiátricas

A presença de comorbidades é também um dos principais fatores que contribui para a heterogeneidade clínica do TDAH. Cerca de 52% das pessoas diagnosticadas com TDAH apresentam pelo menos uma comorbidade e 26,2% apresentam duas ou mais (Jensen e Steinhausen, 2014). Entre elas estão transtornos disruptivos e externalizantes como transtornos de oposição desafiante, transtorno de conduta e transtorno de personalidade antissocial, transtorno por uso de substâncias e transtornos internalizantes como depressão e ansiedade, transtornos de linguagem e transtorno do espectro autista (Katzman et al., 2017).

A comunidade científica vem pesquisando características compartilhadas entre todas as condições psiquiátricas e alterações de comportamento dentro do espectro humano. Estudos realizados com gêmeos mostram que TDAH compartilha muitas de suas características com outros transtornos como, por exemplo, traços de temperamento/personalidade e sintomas externalizantes com transtorno de conduta (Cukrowicz et al., 2006; Hur, 2015). Neuroticismo e déficits nas funções executivas são compartilhados entre TDAH e transtorno do espectro autista (Pinto et al., 2016; Park et al., 2017). Características relacionadas à desatenção são compartilhadas entre TDAH e transtornos de linguagem e aprendizado, sugerindo-se um efeito pleiotrópico dos genes possivelmente envolvidos (Willcutt et al., 2001). Entre TDAH e transtorno por uso de substâncias há o compartilhamento de traços de hiperatividade e impulsividade (Quinn

et al., 2016). Já traços internalizantes e relativos à ansiedade são compartilhados entre TDAH e depressão (Chen et al., 2015). A alta heterogeneidade do TDAH concomitante à alta prevalência de comorbidades dá evidências de que o TDAH compartilha variantes genéticas e fenótipos dentro das condições psiquiátricas (revisado em Tistarelli et al., 2019).

Os estudos genômicos também permitem observar que há um grande compartilhamento de variantes genéticas entre transtornos psiquiátricos. Um grande estudo envolvendo 1.191.588 pacientes com TDAH, transtorno bipolar, transtorno depressivo maior, esquizofrenia e transtornos de ansiedade mostrou uma grande correlação genética entre o TDAH e esses transtornos. Entre os fenótipos avaliados, o uso de tabaco foi positivamente correlacionado com o TDAH, enquanto que anos de escolaridade apresentou correlação negativa. . Esses dados fornecem evidência de que há uma interconexão entre transtornos psiquiátricos, traços cognitivos e de personalidade. Dada a ampla e contínua natureza das características do comportamento humano é possível que indivíduos possam progredir de um diagnóstico a outro ao longo da vida (The Brain Storm Consortium, 2019).

Etiologia do TDAH

A etiologia do TDAH é multifatorial, conforme evidenciado por estudos com famílias, gêmeos e adotados (Thapar et al., 2013), sendo influenciado por uma combinação de variantes genéticas, incluindo variantes comuns e variantes raras, e fatores ambientais (revisado em Faraone e Larsson, 2019). Os fatores ambientais mais fortemente implicados até o momento se referem à gestação e período perinatal como prematuridade e baixo peso ao nascer (Bhutta et al., 2002), uso de álcool (Han et al., 2015; Furtado e Roriz, 2016; Eichler et al., 2017; Eilertsen et al., 2017) e uso de tabaco na gestação (Zhu et al., 2014; Han et al., 2015; Holbrook, 2016; Gustavson et al., 2017). Durante a infância, há evidências implicando traumas, abuso, rejeição parental e violência doméstica (Richards, 2012). Também exposição a toxinas ambientais e aditivos alimentícios vêm sendo associados como fatores de risco para TDAH (Bateman et al., 2004; Nigg et al., 2012; Thapar et al., 2013; Palladino et al., 2019).

O TDAH apresenta um forte componente genético segundo estudos realizados com gêmeos, sendo a sua herdabilidade estimada em torno de 70-80% (Nikolas e Burt, 2010). Em estudos em que são avaliadas famílias, há uma maior prevalência de familiares de pessoas diagnosticadas com TDAH que também apresentam sintomas, principalmente, pais e irmãos (Faraone et al., 2000; Faraone et al., 2005).

Na tentativa de elucidar os mecanismos biológicos subjacentes ao transtorno, muitos estudos de associação de gene candidato foram realizados. As evidências com alguma significância na mais ampla meta-análise já realizada em adultos envolvem o gene *BAIAP2*, envolvido com neurodesenvolvimento associado a diferenças de assimetria direita/esquerda do córtex cerebral em adultos (Bonvicini et al., 2016). Genes de receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos como o *SLC6A3/DAT1* e *DRD4* têm apresentado evidências de associação ao TDAH na infância (revisado em Franke et al., 2011).

Porém, após décadas de estudos e poucas conclusões robustas, as últimas pesquisas, tanto em TDAH quanto em outros transtornos psiquiátricos, têm se concentrado em estudos de associação por varredura genômica (*Genome-wide association studies* - GWAS), que buscam através da união de vários laboratórios e seus pesquisadores analisar variantes genéticas em um grande número de participantes com e sem TDAH. Esta metodologia explora polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) e algumas pequenas deleções e inserções de nucleotídeos. A partir de técnicas estatísticas é avaliada a significância da associação da variante genética com o transtorno que deve ter valores de p menores que 5×10^{-8} para ser considerada significativa devido à correção por múltiplos testes. Este rígido p necessita de um tamanho amostral muito grande, o que ainda é um desafio. O GWAS mais recente para o TDAH foi o primeiro a encontrar associações, apontando 304 variantes genéticas em 12 loci que ultrapassaram o limiar e significância em uma amostra de 20.183 casos e 35.191 controles. Muitas destas variantes estão localizadas em regiões conservadas em mamíferos, ou seja, pressões evolucionárias e de seleção talvez sejam uma importante característica da arquitetura do TDAH. Estes 12 loci não coincidem com os genes candidatos propostos anteriormente, mas apontam genes em potencial para serem explorados de forma ampla como, por exemplo, o gene *FOXP2* que é associado a transtornos de linguagem, sendo

de grande importância sua investigação biológica dentro das diversas apresentações do TDAH (Demontis et al., 2019).

Essas variantes genéticas estatisticamente significativas ao longo do genoma são reunidas e analisadas em redes de conexão e funcionalidade, gerando vias moleculares que ajudarão a entender os mecanismos biológicos subjacentes aos transtornos (Geschwind e Flint, 2015). Para o TDAH, análises envolvendo dados de GWAS e de estudos de associação de transcriptoma tecido-específico (TWAS) revelaram que as principais vias biológicas envolvidas estão relacionadas com diferenciação de neurônios dopaminérgicos, ciclo de liberação do neurotransmissor norepinefrina e atividade de lipase triglicérido (Liao et al., 2019).

Esse tipo de abordagem que avalia os polimorfismos de forma conjunta sob um aspecto funcional vem se desenvolvendo nos últimos anos aumentando bancos de dados e ferramentas de bioinformática, possibilitando novas análises *in silico*.

Gene *FOXP2*

Dentre os 12 loci com significância do GWAS para TDAH está o gene *Forkhead box P2 (FOXP2)* (Demontis et al., 2019). O *FOXP2* foi descrito pela primeira vez a partir da manifestação de um perfil monogênico dominante em indivíduos de uma família na Inglaterra, denominada família KE, onde foi observado um grave transtorno de linguagem e discurso, incluindo alterações motoras orofaciais e cognitivas em três gerações. A mutação identificada foi a substituição de histidina por arginina, na codificação do exon 14, em que está o domínio de ligação mais importante do gene, o *forkhead*. A partir desse momento, intensificaram-se as pesquisas sobre o *FOXP2* para entender seu papel na linguagem (Hurst et al., 1990; Fisher et al., 1998; Lai et al., 2001; Fisher e Scharff, 2009).

Considerando que a linguagem é uma condição importante nos seres humanos, há o interesse por parte dos pesquisadores em desvendar questões evolutivas sobre o neurodesenvolvimento do cérebro e a relação com a regulação gênica promovida pelo *FOXP2*. Estes temas são especialmente relevantes na compreensão das dificuldades modernas nas áreas da atenção e da aprendizagem (Lai et al., 2003).

Em experimentos com ratos (C57BL/6) knockout para *FOXP2*, o resultado foi letal com conseqüente morte prematura, enquanto heterozigotos apresentaram atraso no desenvolvimento, demonstrando que o gene tem grande importância ao longo do desenvolvimento embrionário. Diferentes mutações foram realizadas e os resultados foram, principalmente, atrasos de desenvolvimento e problemas motores (Shu et al., 2005; French et al., 2007; Fujita et al., 2008; Groszer et al., 2008; Enard et al., 2009; revisado em French e Fisher, 2014; French et al., 2018).

Análise molecular do gene *FOXP2*

O *FOXP2* está presente em todos os vertebrados tendo muitas similaridades entre os mamíferos. Encontra-se no cromossomo 7q31 nos humanos, uma região muito conservada evolutivamente. Desde que a linhagem humana se separou dos chimpanzés houve apenas duas trocas de aminoácidos e apenas três trocas entre humanos e ratos (Lai et al., 2001; Enard et al., 2002). O gene *FOXP2* tem 19 transcritos e 17 exons (http://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000128573;r=7:113726382-114333827; Lai et al., 2001). Ele codifica um fator de transcrição composto por 715 aminoácidos que age como repressor de cerca de 285 genes alvo no gânglio basal e no córtex cerebral (Spiteri et al., 2007; Estruch et al., 2016).

A avaliação das áreas cerebrais afetadas em decorrência da mutação do *FOXP2* na família KE permitiu observar que ele é expresso em maior quantidade nas camadas profundas do córtex, na camada VI e em menor quantidade na camada V, mas também no núcleo sensorio que abrange o bulbo olfatório e a região ventral do tálamo, no núcleo límbico, principalmente amígdala e núcleo estriado. Ele é expresso também no cerebelo e núcleo olivar, participando então dos circuitos corticoestriatal e olivocerebelar (Watkins et al., 2002; Lai et al., 2003; Vargha-Khadem et al., 2005).

A análise do gene no córtex, durante a fase embrionária, demonstrou que o *FOXP2* é expresso em neurônios corticotalâmicos, que levam informações sensorias até o gânglio basal. Observou-se um papel na neurogênese e sua ausência resulta em decréscimo do número de neurônios e localização aberrante das populações neuronais, porém sem modificar a arquitetura morfológica do córtex (Tsui et al., 2013; Kast et al.,

2019). A principal alteração encontrada foi a diminuição dos receptores de dopamina do tipo D1R e, conseqüentemente, déficits no aprendizado reverso, utilizando o teste cognitivo Y-maze (Co et al., 2019), indicando que o *FOXP2* tem um papel importante para o desenvolvimento do córtex e para sinalização através das moléculas de dopamina. A mediação por dopamina na área pré-frontal do córtex é relevante para a habilidade de abandonar velhas estratégias e adotar novas como mecanismo de sobrevivência em um ambiente em constante mudança (Cui et al., 2018), além de sua liberação ser bastante sensível à situações de stress (Arnsten, 2009). No contexto social, alterações no comportamento analisadas utilizando parâmetros de vocalização também se mostraram alteradas indicando que o gene influencia socialmente na relação dos ratos com seus pares (Medvedeva et al., 2018).

Os estudos avaliando o *FOXP2* no núcleo estriado mostram que ele é expresso, majoritariamente, em neurônios *medium spiny neurons* (MSN) que também apresentam receptores D1R, participando da via direta excitatória do estriado em detrimento dos neurônios com receptores D2R da via indireta inibitória (Fong et al., 2018). Sabe-se que o estriado recebe inúmeras projeções do córtex e do tálamo (Smith et al., 2004; Sheperd, 2013) e que o balanço de neurotransmissores excitatórios da via direta e inibitórios da via indireta, principalmente, dopamina e ácido gama-aminobutírico (GABA), são responsáveis por codificar estímulos do ambiente e gerar valores positivos e negativos onde a estimulação promoverá o sistema de recompensa enquanto a inibição está associada à punição (Volkow e Morales, 2015; Van Rhijn et al., 2018; Andrianarivelo et al., 2019). Este mesmo mecanismo está envolvido no processo de aprendizagem por associação e, conseqüentemente, modulação do comportamento e planejamento motor (French et al., 2018; Matamales et al., 2020).

Foi observado que o gene tem um papel importante nos neurônios também em relação ao crescimento de neuritos, mecanismo que inclui, entre outras etapas, a orientação axonal, processo relevante para que os neurônios encontrem seus alvos corretamente e formem um feixe nervoso. Também está envolvido na plasticidade sináptica, processo que tem relação com a intensidade da sinapse por meio da quantidade de receptores e resposta aos neurotransmissores, base neuroquímica da memória e do aprendizado (Vernes et al., 2011).

Experimentos também foram realizados em ratos C57BL/6, substituindo o *FOXP2* pela versão humana, que tem três aminoácidos de diferença, e o resultado foi um aumento dos neuritos, principalmente, em neurônios estriatais e aumento da plasticidade sináptica. O *FOXP2* humano parece ter um efeito maior no circuito corticoestriatal do que no circuito cerebelar (Enard et al., 2009). Outros estudos realizados com a versão humana do *FOXP2* mostraram uma melhor habilidade de aprendizado processual, o qual requer exposição repetitiva a um estímulo sensorio induzindo o aprendizado motor, em detrimento do aprendizado declarativo. Os resultados também mostraram diferenças de atividade na região dorsomedial e dorsolateral do estriado indicando que o gene *FOXP2* interfere nos diferentes estágios do aprendizado (Schreiweis et al., 2014; Schreiweis et al., 2019).

***FOXP2* e fenótipos do comportamento**

Há hipóteses de que as mudanças evolucionárias no gene *FOXP2* contribuíram para o aparecimento de novas habilidades comunicativas, permitindo uma maior organização social e potencialmente facilitando o pensamento simbólico e a abstração (Staes et al., 2017). O gene *FOXP2* parece ter um papel importante nas funções cognitivas, sendo amplamente sugerido que participe da integração sensoria motora que conseqüentemente vai influenciar o processo de aprendizado verbal e não verbal possivelmente participando de processos de regulação emocional e/ou cognição social (Vargha-Khadem et al., 2005; Fisher e Marcus, 2006).

Além da linguagem e do TDAH, o gene *FOXP2* tem sido associado a outros fenótipos por meio de GWAS. O gene como um todo (análise *gene-wide*) está associado à susceptibilidade à depressão (Arnau-Soler et al., 2019) e variantes desse gene já foram implicadas em características de neuroticismo, especialmente ao fenótipo irritabilidade (rs10228350) e ao fenótipo tensão (rs1450832) (Nagel et al., 2018). Ao fenótipo de tomada de decisão com tolerância ao risco estão associadas quatro variantes (rs727644, rs7783012, rs10228494, rs1015511) (Clifton et al., 2018; Strawbridge et al., 2018; Linner et al., 2019). As variantes genéticas rs10262462 e rs1859100 influenciam traços de personalidade ativos e passivos que tenham efeito na correlação de interação gene-ambiente no GWAS de maus tratos na infância (Dalvie et al., 2020). O gene também

vem sendo associado a problemas relacionados ao sono (Jansen et al., 2019, Dashti et al., 2019).

Considerando a sobreposição clínica desses fenótipos com o TDAH, é possível que uma ampla variedade de características fenóticas potencialmente moduladas pela variabilidade genética no *FOXP2* também estejam envolvidas na fisiopatologia do TDAH. No entanto, o SNP mais fortemente associado ao TDAH no GWAS, o rs5886709, está localizado em um íntron e até o momento não possui efeitos funcionais descritos.

Portanto, levando em consideração as múltiplas evidências genômicas relacionando o *FOXP2* com transtornos psiquiátricos, e a necessidade de integrar dados biológicos a fim de obter uma abordagem mais ampla dos processos fisiológicos, são necessários mais estudos. A análise *gene-wide* vem sendo proposta como uma boa alternativa na avaliação do papel dos genes e polimorfismos envolvidos em GWAS nas condições psiquiátricas e fenótipos relacionados (Vogel et al., 2014).

Justificativa

Estudos de GWAS e evidências advindas da genética médica e evolutiva apontam para um papel importante do gene *FOXP2* em muitos fenótipos relevantes no comportamento humano. Destaca-se o fato de que o gene é um dos 12 *hits* no maior GWAS já publicado no TDAH. Apesar de muitos avanços sobre o conhecimento dos mecanismos biológicos subjacentes ao TDAH terem sido alcançados, ainda há muito a se esclarecer, especialmente considerando a grande heterogeneidade clínica e genética do transtorno e o envolvimento de variantes de pequeno efeito. Assim, o estudo das variantes genéticas situadas no gene *FOXP2* e os possíveis efeitos de cada uma delas no transtorno e fenótipos relacionados assim como comorbidades tem grande potencial de contribuir para o entendimento dos mecanismos biológicos envolvidos nos TDAH, e a relação com comorbidades e outros fenótipos concomitantes.

Devido a grande complexidade das interações entre genes e fenótipos dentro das condições psiquiátricas e a busca por fenótipos que compartilham variantes genéticas de risco, estudos *gene-wide* mostram-se um passo importante para avaliar os mecanismos biológicos dos transtornos.

Objetivos

Objetivos Gerais

Avaliar as possíveis associações entre variantes do gene *FOXP2* com o TDAH em adultos e seus fenótipos relacionados, que incluem gravidade de sintomas, medidas de personalidade e comorbidades psiquiátricas.

Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do gene *FOXP2* através da abordagem *gene-wide* sobre a susceptibilidade ao TDAH em adultos e fenótipos relacionados;
- Avaliação individual dos resultados com as variantes independentes do *FOXP2* sobre os desfechos;
- Através da utilização de ferramentas de bioinformática, analisar a funcionalidade das variantes associadas.

Capítulo III: Artigo Científico

A ser submetido para *Journal of Psychiatry Research*

Discussão Geral

A expansão dos GWAS, na área da psiquiatria tem se dado com o intuito de investigar a influência de fatores genéticos de risco na variação do comportamento humano. Com isso, novas possibilidades de avaliação são apresentadas assim como novas ferramentas de bioinformática estão sendo desenvolvidas para analisar grande quantidade de dados e avaliar o impacto de um grande número de variantes genéticas distribuídas ao longo do genoma. O mais recente GWAS de TDAH (Demontis et al., 2019) nos forneceu pistas importantes sobre os possíveis mecanismos biológicos do transtorno. No entanto, muito trabalho ainda é necessário para caracterizar o papel de cada gene ou região gênica e todas as possíveis interações.

Nesse estudo, podemos observar que o gene *FOXP2*, um dos *hits* do GWAS de TDAH, parece estar envolvido em fenótipos que vão muito além da linguagem, interferindo em características que podem levar a condições psiquiátricas. O resultado mais robusto deste estudo foi a possível influência de uma inserção/deleção na região 3'UTR do gene *FOXP2* em um conjunto de fenótipos relevantes no TDAH. Esta região do gene é alvo de diferentes miRNAs e está associada a regulação da migração neuronal (Clovis et al., 2012). A participação do gene *FOXP2* no neurodesenvolvimento cerebral é bem estudada, tendo um papel importante no direcionamento e maturação de neurônios sensoriais que levam informações do córtex até o núcleo estriado e depois ao tálamo (Garcia-Calero et al., 2016; Chang et al., 2018). A participação do *FOXP2* no desenvolvimento da amígdala foi associada à regulação emocional do medo (Kuerbitz et al., 2018), estando o gene também associado por GWAS a escores de neuroticismo (Nagel et al., 2018).

O fenótipo mais reconhecido como relacionado à influência do *FOXP2* no processamento de estímulos sensoriais é o aprendizado da linguagem (Day et al., 2019), mas o conjunto geral de evidências sugere que outros fenótipos, tal como a avaliação de risco, também podem estar associados. Para tomar decisões e avaliar risco, levando em consideração regras sociais existentes, é necessário um prévio conhecimento cultural que exige consequentemente avaliação do ambiente. Por sua vez, o TDAH apresenta características e grande correlação com comorbidades que geram riscos elevados a saúde, a privação de liberdade e a problemas de relacionamento (Pollack et al., 2019).

Estes dados indicam que a maturação correta do cérebro é essencial para avaliar o ambiente. No presente trabalho, variantes do gene também foram associadas a características de hiperatividade e uso de tabaco, também sugerindo que o gene influencia aspectos relacionados à tomada de decisão e comportamentos de risco.

Além disso, a liberação de dopamina é influenciada por estímulos do ambiente, tal como o estresse, desta forma interferindo em processos cognitivos no circuito corticoestriatal (Arnsten et al., 2009). A influência do *FOXP2* no sistema dopaminérgico, como mencionado na introdução, é consistente com os nossos achados, considerando o fato de que a dopamina também está associada à hiperatividade e comportamentos de risco tal como uso prolongado de substâncias (Orsini et al., 2015; Klein et al., 2018).

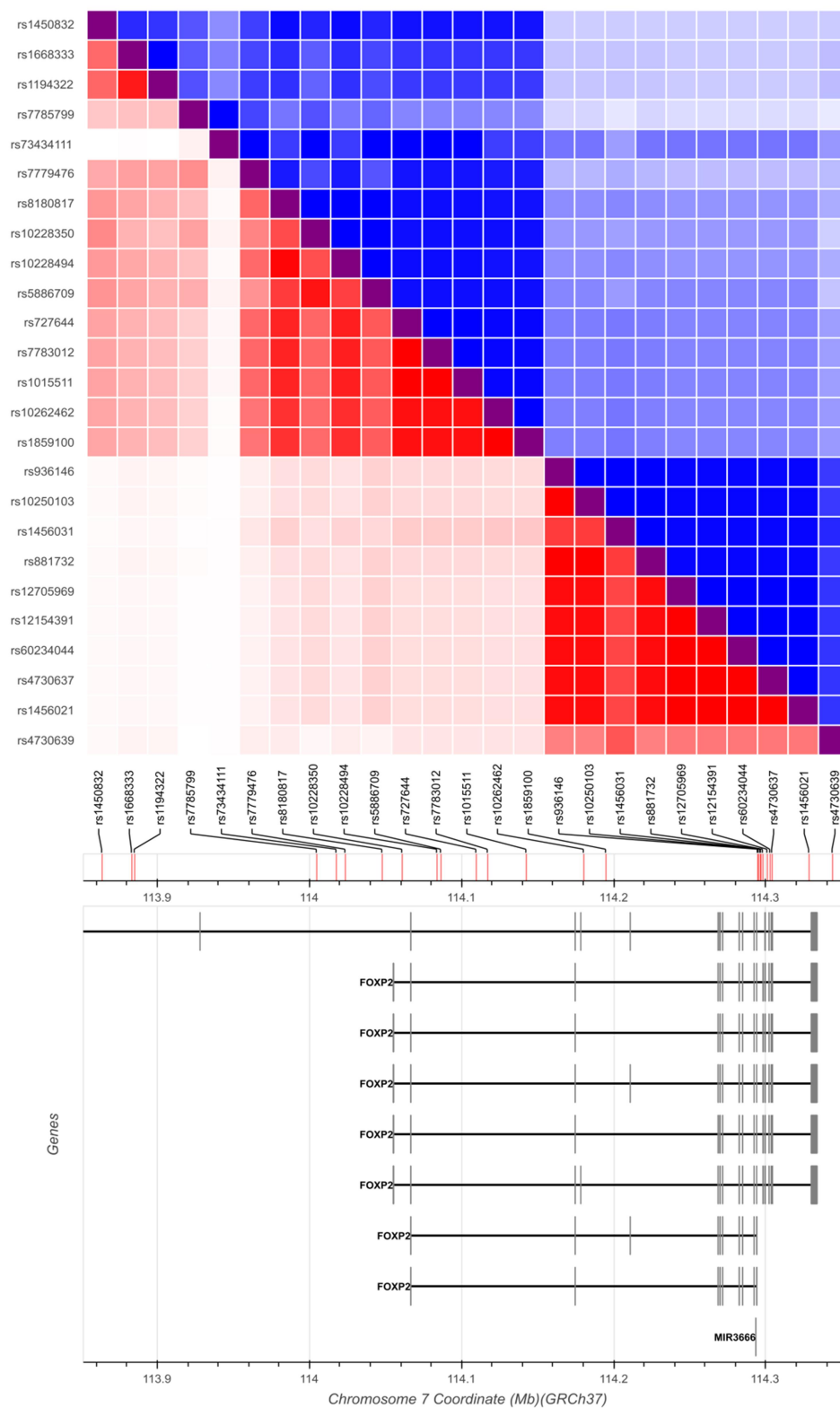
Analisando os dados em conjunto e levando em consideração que variantes do *FOXP2* estão associadas com diferentes fenótipos do comportamento, um gráfico de desequilíbrio de ligação foi gerado para analisar as variantes independentes associadas neste estudo, bem como aquelas com efeitos funcionais preditos *in silico*, em conjunto com variantes associadas em GWAS (Material Suplementar 1; <https://ldlink.nci.nih.gov/?tab=ldmatrix>). O que pode se observar é que rs1450832, associada com neuroticismo (item tensão), está em desequilíbrio de ligação (DL) com as variantes rs1194322 e rs779476 associadas com Trantorno por Uso de Tabaco (TUD). rs7785799 associada com hiperatividade está em DL com variantes associadas à fenótipos de insônia, irritabilidade, tolerância ao risco e maus tratos. As variantes associadas com hiperatividade se encontram na região 3' UTR e estão mais fortemente em DL. Neste gráfico a variante de inserção/deleção rs79622555 não foi incluída por falta de dados da estrutura de DL.

Dentre as limitações da pesquisa, apesar da área genômica crescer diariamente, ainda são necessárias ferramentas mais sofisticadas para a avaliação de SNPs e, principalmente, inserções e deleções. Pouca informação sobre regiões intergênicas e não codificadoras foram encontradas *in silico*, o que limita inferências sobre mecanismos moleculares específicos. Estudos que avaliam a expressão gênica tecido-específica também são relevantes e ainda são escassos. São necessários estudos sobre a funcionalidade de diferentes partes do gene, incluindo regiões não codificadoras, um grande desafio na área da genética humana. Estes incluem análises de cultura celular e

modelos animais, inclusive avaliando o efeito molecular de mutações induzidas por técnicas como *CRISPR/Cas9*. Dentre outras limitações, podemos citar a grande heterogeneidade do TDAH, que apresenta uma variação ampla de sintomas e comorbidades.

O conjunto geral de resultados confirma, ao menos parcialmente, um papel importante do gene *FOXP2* no TDAH e fenótipos relacionados. Além disso, estabelece uma ponte entre estudos que vão desde a genética evolutiva e herança monogênica até a genômica de traços complexos. O avanço desses estudos provavelmente levará o entendimento do gene *FOXP2* para muito além de seu tradicional vínculo com a fala.

Material Supplementar 1



Referências Bibliográficas

- Andrianarivelo, A., et al., 2019. Modulation and functions of dopamine receptor heteromers in drugs of abuse-induced adaptations. *Neuropharmacology*, 152, pp 42-50.
- Arnsten, A. F. T., 2009. Stress signaling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nature Reviews Neuroscience*, 10 (6), pp 410-422.
- APA, 2013. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5^a ed. *American Psychiatric Association*.
- Barkley, R., 1997. Behavioral inhibition, sustained attention, and executive function: constructing an unifying theory of ADHD. *American Psychological Association*, 121, pp 65-94.
- Bateman, B., et al., 2004. The effects of double blind, placebo controlled, artificial food colourings and benzoate preservative challenge on hyperactivity in a general population sample of preschool children. *Archives of Disease in Childhood*, 89:506-511.
- Bhutta, A. T., et al., 2002. Cognitive and behavioral outcomes of school-aged children who were born preterm: a meta-analysis. *JAMA Psychiatry*, 288 (6), pp728-737.
- Bonvicini, C, et al., 2016. Attention-deficit hiperactivity disorders in adults: A systematic review and meta-analysis of genetic, pharmacogenetic and biochemical studies. *Molecular Psychiatry*, 21, pp 872-884.
- Chang, M., et al., 2018. Laminar specific gene expression reveals differences in postnatal laminar maturation in mouse auditory, visual, and somatosensory cortex. *Journal of Comparative Neurology*.
- Chen, T. J., et al., 2016. Genetic and environmental influences on the relationship between ADHD symptoms and internalizing problems: a Chinese twin study. *American Journal of Medical Genetics Part B Neuropsychiatry Genetics*, 171 (7), pp 931-937.
- Clifton, E. A. D., et al., 2018. Genome-wide association study for risk taking propensity indicates shared pathways with body mass index. *Communications Biology* 3, pp 1-36.
- Cloninger, C. R., et al., 1993. A psychobiological model of temperament and character. *Archives of General Psychiatry*, 50, pp 975-990.
- Clovis, Y. M., et al., 2012. Convergent repression of *FOXP2* 3UTR by miR-9 and miR-132 in embryonic mouse neocortex: implications for radial migration of neurons. *Development* 139, pp 3332-3342.
- Co, M., et al., 2019. Cortical *FOXP2* supports behavioral flexibility and developmental dopamine D1 receptor expression, *Cerebral Cortex*, pp 1-16.
- Cukrowicz, K. C., et al., 2006. Personality differences in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder, conduct disorder and controls. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 47 (2), pp 151-159.
- Cui, Q., et al., 2018. Dopamine receptors mediate strategy abandoning via modulation of a specific prelimbic cortex-nucleus accumbens pathway in mice. *PNAS*, 115 (21).

- Dalvie, S., et al., 2020. Genomics influences on self-reported childhood maltreatment. *Translational Psychiatry*, 10.
- Day, N. F., et al., 2019. Beyond Critical Period Learning: Striatal *FOXP2* Affects the Active Maintenance of Learned Vocalizations in Adulthood. *eNeuro*, 6 (2).
- Dashti, H. S., et al., 2019. Genome-wide association study identifies genetic loci for self-reported habitual sleep duration supported by accelerometer-derived estimates. *Nature Communications*, 10.
- Demontis, D., et al., 2019. Discovery of the first genome-wide significant risk loci for ADHD. *Nature Genetics*, 51(1), 63-75.
- Eichler, A., et al., 2017. Effects of prenatal alcohol consumption on cognitive development and ADHD-related behavior in primary-school age: A multilevel study based on meconium ethyl glucuronide. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*.
- Eilertsen, E. M., et al., 2017. Maternal alcohol use during pregnancy and offspring attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD): a prospective sibling control study. *International Journal of Epidemiology* 46: 1633-1640.
- Enard, W. et al., 2002. Molecular evolution of *FOXP2*, a gene involved in speech and language. *Nature*, 418, pp 869-872.
- Enard, W. et al., 2009. A humanized version of *FOXP2* affects cortico-basal ganglia circuits in mice. *Cell*, 137, pp 961-971.
- Estruch, S. B., et al., 2016. The language-related transcription factor *FOXP2* is post-translationally modified with small ubiquitin-like modifiers. *Nature*, 6:20911.
- Faraone, S. V., et al., 2000. Toward guidelines for pedigree selection in genetics studies of attention deficit hyperactivity disorder. *Genetic Epidemiology*, 18, pp 1-16.
- Faraone, S. V., et al., 2005. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biological Psychiatry*, 57, pp 1313-1323.
- Faraone, S. V., Biederman, J., Mick, E., 2006. The age-dependent decline of attention deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis of follow-up studies. *Psychol. Med.* 36 (2), pp 159–165 .
- Faraone, S. V., et al., 2009. Personality traits among ADHD adults: implications of late-onset and subthreshold diagnoses. *Psychological Medicine*, 39, pp 685-693.
- Faraone, S. V., et al., 2015. Attention-deficit/hyperactivity disorder. *Nature Reviews*, 1, pp 1-23.
- Faraone, S. V., Larsson, H., 2019. Genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Molecular Psychiatry*, 24, pp 562-575.
- Fisher, S. E., et al., 1998. Localization of a gene implicated in a severe speech and language disorder. *Nature Genetics*, 18.
- Fisher, S. E., Marcus, G. F., et al., 2006. The eloquent ape: genes, brains and the evolution of language. *Nature Reviews Genetics*, 7:9-20.
- Fisher, S. E., Scharff, C., 2009. *FOXP2* as a molecular window into speech and language. *Cell Press, Trends in Genetics*, 25 (4), pp 166-177.
- Fong, L., et al., 2018. Differential and overlapping pattern of *foxp1* and *FOXP2* expression in the striatum of adult mouse brain. *Neuroscience*.

Franke, B., et al., 2010. Multicenter analysis of the SLC6A3/DAT1 VNTR haplotype in persistent ADHD suggest differential involvement of the gene in childhood and persistent ADHD. *Neuropsychopharmacology*, 35:356-364.

Franke, B., et al., 2011. The genetics of attention deficit/hyperactivity disorder in adults, a review. *Molecular Psychiatry*, pp 1-28.

Franke, B., et al., 2018. Live fast, die young? A review on the developmental trajectories of ADHD across lifespan. *European Neuropsychopharmacology*, 28:1059-1088.

Frazier-Wood, A. C., et al., 2012. Neuropsychological intra-individual variability explains unique genetic variance of ADHD and shows suggestive linkage to chromosomes 12, 13 and 17. *American Journal of Medical Genetics Part B Neuropsychiatric Genetics*, 159b (2), pp 131-140.

French, C. A., et al., 2007. Generation of mice with conditional *FOXP2* null allele. *Genesis*, 45, pp 440-446.

French, C. A., Fisher, S. E., 2014. What can mice tell us about *FOXP2* function? *Current Opinion in Neurobiology*, 28-72-79.

French, C. A., et al., 2018. Differential effects of *FOXP2* disruption in distinct motor circuits. *Molecular Psychiatry*, 24(3), pp 447-462.

Fujita, E. et al., 2008. Ultrasonic vocalization impairment of *FOXP2* (R552H) knockin mice related to speech-language and abnormality of Puncinje cells. *PNAS*, 105, pp 3117-3122.

Furtado, E. F., Roriz, S. T. S., 2016. Inattention and impulsivity associated with prenatal alcohol exposure in a prospective cohort study with 11-years-old Brazilian children. *European Child and Adolescent Psychiatry*, 25:1327-1335.

Garcia-Calero, E., et al., 2016. *FOXP2* protein levels regulate cell morphology changes and migration patterns in the vertebrate developing telencephalon. *Brain Structure and Function*.

Geschwind, D. H., Flint, J., 2015. Genetics and genomics of psychiatry disease. *Science*, 349.

Grevet, E., et al., 2006. Lack of gender effects on subtype outcomes in adults with attention- deficit/hyperactivity disorder. *European Archives of Psychiatric and Clinical Neuroscience*, 256, pp 311-319.

Gomez, R., et al., 2012. Attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms in an adult sample: associations with Cloninger's temperament and character dimensions. *Personality and Individual Differences*, 52, pp 290-294.

Gomez, R., Corr P. J., 2014. ADHD and personality: a meta-analytic review. *Clinical Psychology Review*.

Groszer, M., et al., 2008. Impaired synaptic plasticity and motor learning in mice with a point mutation implicated in human speech deficits. *Current Biology*, 18, pp 354-362.

Gustavson, K., et al., 2017. Smoking in pregnancy and child ADHD. *Pediatrics* 139 (2).

- Han, J. K., et al., 2015. The effects of prenatal exposure to alcohol and environmental tobacco smoke on risk for ADHD: A large population-based study. *Psychiatry Research* 225: 164-168.
- Holbrook, B. D., 2016. The effects of nicotine on human fetal development. *Birth Defects Research Part C: Embryos Today Reviews*, 108:181-192.
- Huang-Pollock, C. L., et al, 2012. Evaluating vigilance deficits in ADHD: a meta-analysis of CPT performance. *Journal of Abnormal Psychology*, 121 (2), pp 360-371.
- Hur, Y. M., 2015. Genetic and environmental etiology of the relationship between childhood hyperactivity/inattention and conduct problems in a south Korean twin sample. *Twin Research Human Genetics*, 18 (3), pp 290-297.
- Hurst, J. A., et al., 1990. An extended family with a dominantly inherited speech disorder. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 32, 374-355.
- ICD-11. International Classification of diseases for mortality and morbidity statistics, eleventh revision, 2018. *World Health Organization*.
- Instanes, J. T., et al., 2016. Personality traits and comorbidity in adults with ADHD. *Journal of Attention Disorders*, 20 (10), pp 845-854.
- Jansen, P. R., et al., 2019. Genome-wide analysis of insomnia in 1.331.010 individuals identifies new risk loci and functional pathways. *Nature Genetics*.
- Jensen, C., Steinhausen, H., 2014. Comorbid mental disorder in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder in a large nationwide study. *Attention Deficit and Hyperactivity Disorders*, janeiro; 6.
- Karalunas, S. L., et al., 2014. Annual research review: reaction time variability in ADHD and autism spectrum disorder: measurement and mechanisms of a proposed trans-diagnostic phenotype. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 55 (6), pp 685-710.
- Karalunas S. L., Nigg, J. T., 2019a. Heterogeneity and subtyping in attention-deficit/hyperactivity disorder-considerations for emerging research using person-centered computational approaches. *Biological Psychiatry*.
- Karalunas, S. L., et al., 2019b. Do we need an irritable subtype of ADHD? Replication and extension of a promising temperament profile approach to ADHD subtyping. *Psychological Assessment*, 31 (2), pp 236-247.
- Kast, R. J., et al., 2019. *FOXP2* exhibits projection neuron class specific expression, but is not required for multiple aspects of cortical histogenesis. *eLife*, 8.
- Katzman, M. A., et al., 2017. Adult ADHD and comorbid disorders: clinical implications of a dimensional approach. *BMC Psychiatry*, 17:302.
- Kieling, R., Rohde, L., 2010. ADHD in children and adults: diagnosis and prognosis. *Current Topics in Behavioral Science*, 9, pp 1-16.
- Klein, M., O., et al., 2018. Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology* , 39, pp 31–59.
- Kuerbitz, J., et al., 2018. Loss of Intercalated Cells (ITCs) in the Mouse Amygdala of *Tshz1* Mutants Correlates with Fear, Depression, and Social Interaction Phenotypes. *The Journal of Neuroscience*, 38(5), pp 1160–1177.
- Lai, C., et al., 2001. A Forkhead-Domain Gene Is Mutated in a Severe Speech and Language Disorder. *Nature*, 413 (6855), pp 519-523.

- Lai, C., et al., 2003. *FOXP2* expression during brain development coincides with adult sites of pathology in a severe speech and language disorder. *Brain*, 216, pp 2455-2462.
- Liao, C., et al., 2019. Transcriptome-wide association study of attention-deficit/hyperactivity disorder identifies associated genes and phenotypes. *Nature Communications*.
- Linner, R. K., et al., 2019. Genome-wide association analyses of risk tolerance and risky behaviors in over 1 million individuals identify hundreds of loci and shared genetics influences. *Nature Genetics*, 51, pp 245-257.
- Matamalas, M., et al., 2020. Local D2-to D1- neuron transmodulation updates goal-directed learning in the striatum. *Science*, 367, pp 549-555.
- Matte, B., et al., 2012. ADHD in adults: a concept in evolution. *ADHD Attention Deficit Hyperactivity Disorders*, 4, pp 53-62.
- Medvedeva, V. P., et al., 2018. Altered social behavior in mice carrying a cortical *FOXP2* deletion. *Human Molecular Genetics*.
- Murray, A., et al., 2018. Sex differences in ADHD trajectories across childhood and adolescence. *Developmental Science*, junho, pp 1-11.
- Nagel, M., et al., 2018. Item-level analyses reveal genetic heterogeneity in neuroticism. *Nature Communications*, 9:905.
- Nigg, J. T., et al., 2002. Big five dimensions and ADHD symptoms: links between personality traits and clinical symptoms. *Journal of Personality and Social Psychology*, 83 (2), pp 451-469.
- Nigg, J. T., et al., 2012. Meta-analysis of Attention-deficit/hyperactivity Disorder or Attention-deficits/hyperactivity Disorder symptoms, restriction, diet and synthetic food color additives. *Journal of American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 51(1):86-97.
- Nigg, J. T., et al., 2020. Evaluating Chronic Emotional Dysregulation and Irritability in Relation to ADHD and Depression Genetic Risk in Children With ADHD. *J Child Psychol Psychiatry*, 61 (2), pp 205-214.
- Nikolas, M. A., Burt, S. A., 2010. Genetic and environmental influences on ADHD symptom dimensions of inattention and hyperactivity: A metaanalysis. *Journal of Abnormal Psychology*, 119(1), pp 1-17.
- Nikolas, M. A., et al., 2019. The role of neurocognitive tests in the assessment of adult Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Psychological Assessment*, 31 (5), pp 685-698.
- Orsini, C. A., et al., 2015. Neural mechanisms regulating different forms of risk-related decision-making: Insights from animal models. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 58, pp 147-167.
- Palladino, V. S., et al., 2019. Genetics risk factors and gene-environment interactions in adult and childhood attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychiatry Genetics*, 29: 63-77.
- Park, S. H., et al., 2017. Neuroticism and the overlap between autistic and ADHD traits: findings from a population sample of young adult Australian twins. *Twin Research Human Genetics*, 20 (4), pp 319-329.

Pennigton, B., 2005. Toward a new neuropsychological model of attention-deficit hyperactivity disorder: subtypes and multiple deficits. *Biological Psychiatry*, 57, pp 1221-1223.

Pievsky, M. A., McGrath, R. E., 2018. The neurocognitive profile of attention-deficit/hyperactivity disorder: a review of meta-analyses. *Archives of Clinical Neuropsychology*, 33 (2), pp 143-157.

Pinto, R., et al., 2016. The genetic overlap of attention-deficit/hyperactivity disorder and autistic-like traits: an investigation of individual symptom scales and cognitive markers. *Journal of Abnormal Child Psychology*, 44 (2), pp 335-345.

Polanczyk, G., et al., 2007. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *American Journal of Psychiatry*, 164, pp 942-948.

Polanczyk, G., et al., 2014. ADHD prevalence estimates across three decades: an update systematic review and meta-regression analysis. *International Journal of Epidemiology*, janeiro, pp 434-442.

Pollack, Y., et al., 2019. Risk-taking behavior in attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD): a review of potential underlying mechanism and interventions. *Current Psychiatry Reports*, pp 21-33.

Quinn, P. D. et al., 2016. Childhood attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms and the development of adolescent alcohol problems: a prospective, population-based study of Swedish twins. *American Journal of Medical Genetics Part B Neuropsychiatry Genetics*, 171 (7), pp 958-970.

Richards, L., 2012. It is time for a more integrated bio-psycho-social approach to ADHD. *Clinical Child Psychology and Psychiatry*, 18 (4), pp 483-503.

Salgado, C. A., et al., 2009. Inattention and hyperactivity dimensions of ADHD are associated with different personality profiles. *Psychopathology*, 42, pp 108-112.

Shepherd, G. M. G., 2013. Corticostriatal connectivity and its role in disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 14 (4), pp 278-291.

Schreiweis, C., et al., 2014. Humanized *FOXP2* accelerates learning by enhancing transitions from declarative to procedural performance. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 111 (39), pp 14253-14258.

Schreiweis, C., et al., 2019. Mice carrying a humanized *FOXP2* knock-in allele show region-specific shifts of striatal *FOXP2* expression levels. *Cortex*, 118, pp 212-222

Shu, W., et al., 2005. Altered ultrasonic vocalization in mice with a disruption in the *FOXP2* gene. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 102 (27), pp 9643-9648.

Simon, V., et al., 2009. Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis. *The British Journal Of Psychiatry*, 194, pp 204-211.

Smith, Y., et al., 2004. The thalamostriatal system: a highly specific network of thal basal ganglia circuitry. *Trends in Neuroscience*, 27 (9).

Spiteri, E., et al., 2007. Identification of the transcriptional targets of *FOXP2*, a gene linked to speech and language, in developing human brain. *The American Journal of Human Genetics*, 81.

- Staes, N., et al., 2017. *FOXP2* variation in great ape population offers insight into the evolution of communication skills. *Nature Scientific Reports*, 7.
- Strawbridge, R. J., et al., 2018. Genetics of self-reported risk taking behavior, trans-ethnic consistency and relevance to brain gene expression. *Translational Psychiatry*, 8.
- Stuss, D. T., et al., 1992. “No longer Gage”: Frontal lobe dysfunction and emotional changes. *Journal Of Consulting and Clinical Psychology*, 60, pp 349-359.
- Tistarelli, N., et al., 2019. The nature and nurture of ADHD and its comorbidities: a narrative review on twin studies. *Neuroscience and Behavioral Reviews*.
- Thapar, A., et al., 2013. Practitioner Review: What have we learnt about the cases of ADHD. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 54:1, pp 3-16.
- Thapar, A., Riglin, L., 2020. The importance of a developmental perspective in Psychiatry: what do recent genetic-epidemiological findings show? *Molecular Psychiatry*.
- The Brain Storm Consortium, 2018. Analysis on shared heritability in common disorders of the brain. *Science*, 360, 1-12.
- Tsui, D., et al., 2013. *FOXP2* regulates neurogenesis during embryonic cortical development. *The Journal of Neuroscience*, 33(1), pp 244-258.
- Van Dijk, F. E., et al., 2017. Five factor model personality traits relate to adult attention-deficit/hyperactivity disorder but not to their distinct neurocognitive profiles. *Psychiatry Research*, 258, pp 255-261.
- Van Rhijn, J.R., et al., 2018. *FOXP2* loss of function increases striatal direct pathway inhibition via increased GABA release. *Brain Structure and Function*, 223, pp 4211-4226.
- Vargha-Khadem, F., et al., 2005. *FOXP2* and the neuroanatomy of speech and language. *Nature Reviews Neuroscience*, 6:131-138.
- Vernes, S.C., et al., 2011. *FOXP2* regulates genes networks implicated in neurite outgrowth in the developing brain. *PLOS Genetics*, vol 7.
- Vogel, S., et al., 2014. Linking genetic variants of the mineralocorticoid receptor and negative memory bias: Interaction with prior life adversity. *Psychoneuroendocrinology*, 40, pp 181-190.
- Volkow, N. D., Morales, M., 2015. The brain on drugs from reward to addiction. *Cell*, 162.
- Watanabe K., et al., 2019. A global overview of pleiotropy and genetic architecture in complex traits. *Nature Genetics*, 51 (9), pp 1339-1348.
- Watkins, K. E., et al., 2002. MRI analysis of an inherited speech and language disorder: structural brain abnormalities. *Brain*, 125, pp 465-478.
- Wilcutt, E. G., et al., 2001. A comparison of the cognitive deficits in reading disability and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Journal of abnormal Psychology*, 110 (1), pp 157-172.
- Willcutt, E. G., et al., 2005. Validity of the executive function theory of attention-deficit/hyperactivity disorder: a meta-analytic review. *Biological Psychiatry*, 57 (11), pp 1336-1346.

Willcutt, E. G., 2012. The prevalence of DSM-IV attention-deficit/hyperactivity disorder: a meta analytic review. *Neurotherapeutics*, 9, 490-499.

Willamson, D., Johnston, C., 2015. Gender differences in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: a narrative review. *Clinical Psychology Review*, 40, pp 15-27.

Yochman, A., Ornoy, A., Parush, S., 2006. Co-occurrence of developmental delays among preschool children with attention-deficit-hyperactivity disorder. *Dev Med Child Neurol*, 48, pp 483–488.

Zhu, J.L., et al., 2014. Parental smoking during pregnancy and ADHD in children: The Danish National Birth Cohort. *Pediatrics*, 134: 382-388.