



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Factors Genètics de Susceptibilitat al Trastorn per Dèficit d'Atenció amb Hiperactivitat



Tesi Doctoral

Iris Garcia Martínez

Institut de Recerca Vall d'Hebron
Universitat Autònoma De Barcelona

2017

Factors Genètics de Susceptibilitat al Trastorn per Dèficit d'Atenció amb Hiperactivitat

Memòria presentada per

Iris Garcia Martínez

Per optar al grau de

Doctora en Genètica per la Universitat Autònoma de Barcelona

**Programa de Doctorat en Genètica
Departament de Genètica i Microbiologia
Facultat de Biociències
Universitat Autònoma de Barcelona
Juny 2017**

Tesi Doctoral realitzada sota la direcció de la Dra. Marta Ribasés Haro i la tutorització del Prof. Ricard Marcos Dauder, i desenvolupada en el grup de Psiquiatria Genètica de l'Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR), Barcelona.

Directors		Tutor	Doctoranda
Dra. Marta Ribasés Haro	Dr. Josep Antoni Ramos Quiroga	Prof. Ricard Marcos Dauder	Iris Garcia Martínez

Agraïments

El que llegireu a continuació no és res que no sapigueu. Potser, pot haver-se esvaït una mica amb el temps; de vegades, pot enturviar-se i no definir-se; i d'altres, pot no ser cregut. Però són veritats; realitats que, de tant en tant, cal verbalitzar, per tal que no s'evaeixin del tot, no es tornin completament opaques, i perdin tota la credibilitat.

El que llegireu a continuació, és l'empremta escrita d'aquesta veritat.

Gràcies a tu, Marta Ribasés. Gràcies per trencar davant meu el paper amb l'oferta per realitzar les pràctiques de màster al teu grup d'investigació. Per acollir-me sense saber si arribaria al nivell, i per fer-m'hi arribar. Per explicar-me vuit vegades com es calcula l'FDR. Per la teva iniciativa -que no l'atura mai res-, per no conformar-te i sempre donar-ho tot per millorar, per no aturar-te davant els reptes. Per la teva qualitat científica i com a persona, per no deixar-te amedrentar i fer les coses amb el màxim rigor. Per donar-me tots aquests anys l'oportunitat de créixer al teu costat, d'aprendre amb tu i de tu, de contagiar-me dels teus valors i la teva energia. Per ser el model d'investigadora que vull seguir.

Gràcies a tu, Cristina Sánchez. Gràcies per donar-li el meu nom a la Marta i desencadenar els 5 anys d'investigació que han donat com a resultat aquest treball i la persona que sóc ara. Gràcies per aquell "I què, com ho portes?", a la sala d'espera d'extraccions, ara fa més de sis anys. Gràcies per ensenyar-me a créixer, a madurar, i guanyar independència. Gràcies per ensenyar-me a extreure fins la darrera gota de profit dels recursos disponibles. A inventar, a crear, improvisar. A fer màgia al laboratori. A pensar. I a discutir. A ser més forta. I sobretot, gràcies per regalar-me infinits moments de riure ple, autèntic i profund, dels que deixen agulletes a les galtes i marques al cor. Per regalar-me un dels millors estius de la meva vida. Tu, i la Marta Vila.

Gràcies a tu, Marta Vila. Per descobrir-me el teu món. Per ensenyar-me a viure amb intensitat i, alhora, senzillesa, cada instant. Gràcies per cadascun dels colors que vesteixes i que alegren el dia. Gràcies per integrar-me i acollir-me, i per ensenyar-me les meves primeres pases com a científica. Per cadascun d'aquests riures tan esplèndits, enormes, embriagadors... tan vius! Per totes les vegades que m'has fet plorar de riure pur. Tan gegant, que no m'hi cabia, i s'escapava per tot arreu: per la boca, pels ulls, per les cames fent figa, per la panxa fent mal, per les galtes... I per la teva calma, i la teva pau. Gràcies, a tu també, per aquell estiu.

Gracias a ti, Paola Contreras. Eres una de las personas que más me alegro de haber conocido. Gracias por tu fuerza y tu vitalidad, tus opiniones, tu integridad y tu compromiso. Por tu forma tan clara de ver las cosas. Por enseñarme a verlas como lo haces tu. Por la energía que transmites, y la alegría. Por cada cartelito,

dibujito o baile que me has enseñado y me ha dado ánimos para seguir adelante, más de lo que te puedas imaginar.

Gràcies a les meves companyes de laboratori. Gràcies, Paula Rovira, per aquesta originalitat que desprens, tant autèntica, tan neta, i tan brillant. Brilles. Per la teva sed de satisfer la curiositat, amb la que em sento totalment vinculada. Per cada frase feta que descobrim, per cada línia de comandes R que aconseguim entendre, per cada conversa en la que analitzem el món i tractem d'entendre'l i millorar-lo. I tot, "abans d'anar a dormir". Gràcies, Eva Calvo, per construir un pont entre el laboratori i els pacients, i explicar-me milions de coses sempre que t'he preguntat. Gràcies Mireia Pagerols, per mostrar-me la teva eficiència com a investigadora i per compartir cafès i xerrades a la terrassa de trauma.

Gràcies a les meves companyes de viatge.

Gràcies també al Prof. Miquel Casas i al Dr. Josep Antoni Ramos, per haver-me donat l'oportunitat de formar part del seu equip.

Gràcies a tu, Bru, per tota la teva ajuda. Per la teva feina acurada, per ajudar-me a millorar. Per la teva simpatia i alegria. I pels dies del Congrés a Israel i els riures al Dead Sea. També hauria de saludar al Shushi...

Gràcies a tu, Irene López, per cuidar de mi a la Universitat -portar-me l'horari i recordar-me els treballs!-. Perdona per barejar "cloruro de no sé qué con no sé cuantos.., y hacer una reacción que lo flipas" a la primera pràctica de la carrera, treient fum verd per un tub d'assaig que hauria d'haver estat manipulat dins una campana! I per ajudar-me a créixer. Gràcies per tenir les coses tan clares, per tenir seguretat, per no frenar-te mai. Per ser tan valenta. I gràcies per tots i cadascun dels "mossos" que hem compartit, fent safareig! Per deixar-me formar part de la teva vida. Em fa molta il·lusió.

Gràcies a tu, Alba. Per tot. Absolutament, tot. Per cada consell, per cada pista de com interpretar la vida. Per mostrar-me, de vegades, les coses com són. Per contagiarme la teva vitalitat, la teva energia, la teva felicitat!! Al teu costat, és impossible no sentir-se viva. Per escoltar-me, i estar allà sempre. Gràcies per aquell "Hola, jo em dic Alba", a la terrassa de la Georgina ara fa més de 10 anys (12?) Gràcies per cada tarda, per cada sopar. Tu, La Judit i jo. Gràcies Judit Àngel per compartir amb mi part de la teva vida. Per la teva convicció. Per la teva intensitat. Gràcies també per escoltar-me i per riure't amb mi. Gràcies a les dues per fer safareig. Quedem dividres?

Gràcies als meus avis i als meus avós. Si sóc com sóc, és, en part, gràcies a vosaltres. I no em refereixo només als gens. Jo no he pogut viure el que heu viscut vosaltres. Jo no he contribuït a evitar un enfrontament amb un buc francès durant la guerra civil, evitant el combat i la mort de moltes persones; ni he perdut una germana, el pare o la mare. Jo no he hagut de repartir un ou ferrat entre tres boques, i cuidar-me'n dels meus dos fills tota sola. Tanmateix, mantinc present aquestes vivències, i marco els meus passos amb elles, em guien i em fan millor persona. Heu lluitat per donar als vostres fills (el meus pares) tot el que heu tingut a l'abast. I això no es pot oblidar. S'ha de recordar. S'ha de valorar. I ha de servir. Gràcies a la vostra feina, els meus pares i jo no haurem de patir el que heu patit vosaltres. Gracias abuelita, por tu fuerza infinita, por tu sonrisa inagotable, por tu inteligencia, por aguntarme de pequeña. Por tu "mientras el cuerpo me eche sombra...". Perdona que no supiera más. Gracias avó, por cuidar do meu pai, e máis a min. Por ser tan bo. Gracias aboa. Gracias madriña, que aínda que non coincidimos, coidaches do meu pai e coñezoches a través de él.

Gràcies. Infinites gràcies a la meva família quimacaquimona. Ho sou tot per mi. Ho heu donat tot per mi. Ho doneu tot, per mi. I estic segura, sense ni una mínima ombra de dubte, que seguireu donant-ho tot per mi. Per això, no existeix cap forma que jo us pugui retornar tot això. El vostre amor, carinyo, i cura. No us puc tornar el temps que heu invertit en mi. Cada minut que m'heu acompanyat quan he estat sola. Cada minut que m'heu regalat de vida, agafant-lo de la vostra. Tot el que vaig poder fer de petita, mentre vosaltres us en privàveu. Per ensenyar-me a llegir. Per cada tarda a la meva habitació ajudant-me a estudiar, i per tots els treballs que va fer amb mi. Per cada ocell que conec. No sé a qui haig d'agair que se n'anés la llum de casa, però gràcies a vosaltres per posar una espelma i jugar al parxís amb mi. Gràcies per portar-me un suc de taronja d'amagades al llit. Gràcies a ensenyar-me a anar fins al fons del Bar. Gràcies per impregnar-me de l'estima per les plantes, els arbres i les llavors; per la terra. Gràcies, també, per ensenyar-me a no rendir-me, en veureu a vosaltres lluitant amb tot el que teníeu, amb tot el que sou. Per seguir lluitant avui, cada dia, amb totes les dificultats que, malauradament, sorgeixen, alienes a vosaltres. Per ensenyar-me a ser compromesa, a no desentendre'm dels problemes; a implicar-me, a voler millorar el món. Per mi i pels altres. Gràcies per ensenyar-me a estimar les coses, a valorar-les, per més petites que siguin. I em disculpareu que em detingui aquí. Perquè no tinc línies al món per citar totes les coses que us agraeixo; ni abraçada prou forta per expressar-vos-en la intensitat. Per això us abraçaré totes les vegades que pugui cadascun dels dies de la meua vida, d'aquesta i de les que vinguin més endavant. Pita, ets el que més estimo del món. Des de sempre i per sempre. Impertèrrit. Gràcies per voler-me i cuidar-me, quan encara no em coneixies. Gràcies per venir-me a buscar enmig del simulacre de bomba, per no importar-te res més que estar amb mi. Gràcies per amagar les cigarretes dels pares en paquets de regals de nadal i penjar-los cada any amb mi a l'arbre. Cada any. Per dormir amb mi. Per un "Senyor Ben Senyora", un "Darro, se shevan al niño", per un "César

Romero era alto” i un “achuchar”. Per cada mirada teva que em fa riure. Per cada nit de largartijilla andrajosilla al teu llit, enfonsant les cares al coixí per afluixar els riures que ens invaiien, per evitar que la mama ens sentís. M'esforçaré tots els dies per mantenir vives cadascuna de les coses que heu dipositat amb mi, i les mostraré amb orgull, i seran la força que m'ajudaran a tirar endavant. Així és ara. Com la figuera de casa: que ja li poden tallar el tronc i les branques mil vegades mil cops, que les arrels són fortes, i profundes, i així reneix de nou.

I perdoneu-me pels meus errors passats. No sabia més. I perdoneu els presents i els futurs. No en seré conscient.

Gràcies a tu, Àlex Domínguez. Per triar-me, per lluitar per mi. Per venir aquella nit a preguntar-me què volia. Quan la resposta era que et volia a tu. Gràcies per fer-me descobrir l'amor. Sona com sona, però és així. Per la teva ingenuïtat viva, per la teva alegria, que em fa lleugera, liviana, i em deslliura de les càrregues més feixugues que aconsumo a carregar. Gràcies per compartir el teu temps amb mi, per quedar-te amb mi. Per amagar-te per compar-me unes arracades, per demanar macarrons vegans i menjar-te'ls, i per saber que prefereixo un roser. Per salvar caragols. Per entendre i comprendre els meus sentiments.

Aquest treball ha estat possible perquè, durant tot aquest temps, cadascún de vosaltres ha estat al meu costat. Perquè jo sóc jo; perquè vosaltres sou vosaltres.

El que llegireu a continuació no és res que no sapigueu.

Gràcies.

“Biòloga molecular”. Recordeu?

No és exactament la mateixa idea que tenia als 5 anys, però aquí està.

Benvinguts. Paseu, paseu...

ÍNDEX

Abreviatures	3
---------------------------	----------

INTRODUCCIÓ

1. Introducció al TDAH	11
1.1. Clínica del TDAH	11
1.1.1. Simptomatologia	11
1.1.2. Diagnòstic i classificació	12
1.1.3. Evolució al llarg de la vida	13
1.1.4. Comorbiditat	16
1.2. Conceptualització històrica del TDAH i la seva simptomatologia	17
1.3. Epidemiologia	21
1.3.1. Prevalença infantil i adulta	21
1.3.2. Distribució per categories diagnòstiques	22
1.3.3. Distribució per sexe i ètnia	22
1.4. Impacte socioeconòmic	23
1.5. Fisiopatologia	25
1.5.1. Disfunció de dominis cognitius, xarxes neuronals i sistemes de neurotransmissió	26
1.5.2. Neuroimatge	30
1.6. Tractament	33
1.6.1. Tractament no farmacològic	33
1.6.2. Tractament farmacològic	34
2. Etiologia del TDAH	37
2.1. Factors genètics	39

2.1.1.	Variants genètiques de risc en el TDAH	39
2.1.1.1.	Estudis de lligament genètic	41
2.1.1.2.	Estudis d'associació	43
2.1.1.3.	Estudis de variacions en el nombre de còpies (CNV)	51
2.1.1.4.	Estudis genètics de metanàlisi	51
2.1.2.	Perfils d'expressió gènica	54
2.1.2.	Anàlisi de loci de trets quantitativs d'expressió (eQTLs)	57
2.2.	Factors ambientals	57
2.3.	Interacció gen-ambient: epigenètica	59
2.3.1.	Metilació de l'ADN i modificació post-traducciona d'histones	59
2.3.2.	Els microARNs	61
2.3.2.1.	Biosíntesi	62
2.3.2.2.	Mecanisme d'acció	63
2.3.2.3.	Regulació de la biosíntesi i funció dels microARNs	64
2.3.2.4.	MicroARNs, trastorns psiquiàtrics i TDAH	65

HIPÒTESI I OBJECTIUS

1.	Hipòtesi 1 i Objectius	71
2.	Hipòtesi 2 i Objectius	73

RESULTATS

1.	Secció 1: Impacte de la variació genètica en elements reguladors de l'expressió gènica: Estudis d'associació cas-control basats en microARNs i gens candidats pel TDAH	79
1.1.	Resum Article 1. Evaluation of single nucleotide polymorphisms in the miR-183-96-182 cluster in adulthood attention-deficit and hyperactivity disorder (ADHD) and substance use disorders (SUDs)	79
1.2.	Resum Article 2. Preliminary evidence for association of genetic variants in pri-miR-34b/c and abnormal miR-34c expression with attention deficit and hyperactivity disorder	81
	Article 2	83

2. Estudi de la base genètica del TDAH per mitjà de l'anàlisi massiu de variants genètiques: Estudis d'associació a escala genòmica (GWAS) basats en variants polimòrfiques de nucleòtid únic (SNP) i basats en gens, i anàlisis d'enriquiment funcional i vies de senyalització cel·lular	93
2.1. Resum Article 3. Case-control genome-wide association study of persistent attention-deficit hyperactivity disorder identifies <i>FBXO33</i> as a novel susceptibility gene for the disorder	93
2.2. Resum Article 4. Gene-wide Association Study reveals <i>RNF122</i> Ubiquitin Ligase as a Novel Susceptibility Gene for Attention Deficit Hyperactivity Disorder	95
Article 4.	97

DISCUSSIÓ

1. Consideracions sobre els resultats obtinguts	131
1.1. El paper dels microARNs en el TDAH: els grups miR-183-96-182 i miR-34b/c	132
1.2. Estudis d'associació a escala genòmica en TDAH persistent	135
1.2.1. El gen <i>FBXO33</i>	135
1.2.2. El gen <i>RNF122</i>	137
1.2.3. El paper del sistema ubiquitina-proteosoma en els trastorns psiquiàtrics i el TDAH	140
1.3. Regulació recíproca entre el sistema ubiquitina-proteosoma i els microARNs	144
2. Consideracions sobre la metodologia emprada	147
2.1. La mostra d'estudi	147
2.1.1. Selecció de la mostra de TDAH i poder estadístic.	147
2.1.2. Selecció de la mostra control i estratificació poblacional	150
2.2. Correccions per múltiples tests estadístics	151
2.3. Estudis de rèplica	154

2.4.	Consideracions dels estudis genètics d'associació cas-control poblacionals	156
2.4.1.	Selecció de gens i regions candidates	156
2.4.2.	Selecció de polimorfismes	157
2.4.3.	Error de genotipació	159
2.4.4.	Estimació de les freqüències haplotípiques	159
2.4.5.	Interacció gen*gen i gen*ambient	160
2.5.	Consideracions dels estudis d'expressió	161
3.	Perspectives de futur	164

CONCLUSIONS

1.	Conclusions	173
-----------	------------------------------	------------

BIBLIOGRAFIA

1.	Bibliografia	177
-----------	-------------------------------	------------

ANNEX

1.	Annex 1 (Article 1). Evaluation of single nucleotide polymorphisms in the miR-183-96-182 cluster in adulthood attention-deficit and hyperactivity disorder (ADHD) and substance use disorders (SUDs)	227
2.	Annex 2 (Article 3). Case-control genome-wide association study of persistent attention-deficit hyperactivity disorder identifies <i>FBXO33</i> as a novel susceptibility gene for the disorder	241

ABREVIATURES

5-HT	Serotonina
5-HTTLPR	Regió polimòrfica del promotor del transportador de serotonina SLC6A4
ACh	Acetilcolina
ADRA1B	Receptor adrenèrgic alfa 1B
ADRA2A	Receptor adrenèrgic alfa 2A
ADRA2B	Receptor adrenèrgic alfa 2B
ADRA2C	Receptor adrenèrgic alfa 2C
ADRB1	Receptor adrenèrgic beta 1
ADRB2	Receptor adrenèrgic beta 2
AGO	Argonauta
AGO1	Argonauta 1
AGO2	Argonauta 2
AGO4	Argonauta 4
ANKFY1	Contenedor de domini FYVE i repeticions d'ankirina
ARNm	ARN missatger
ARVCF	Gen de la repetició Armadillo delecionat a la síndrome velocardiofacial
ASTN2	Astrotactina 2
ATP2C2	ATPasa transportadora de calci tipus 2C membre 2
BAIAP2	Proteïna associada a BAI1 2
BCHE	Butirilcolinesterasa
BDNF	Factor neurotròfic cerebral
CALY	Proteïna vesicular dependent de calcineuron
CCA	Còrtex cingulat anterior
CCSER1	Proteïna enriquida en serina bobina-enrotllada
CDH13	Caderina 13
CGAS	Estudi d'associació de gens candidats
CHRNA3	Receptor d'acetilcolina nicotínic alfa 3
CHRNA4	Receptor d'acetilcolina nicotínic alfa 4
CHRNA7	Receptor nicotínic d'acetilcolina A7
CHRNB4	Receptor d'acetilcolina nicotínic beta 4
CNR1	Receptor cannabinoide 1
CNTF	Factor neurotròfic ciliar
CNTFR	Receptor del factor neurotròfic ciliar

CNV	Variants en el número de còpies
COMT	Catecol-O-metiltransferasa
CPF	Còrtex prefrontal
CPLX2	Complexina 2
CPLX4	Complexina 4
CRHBP	Hormona alliberadora de corticotropina
CTNNA2	Catenina alfa 2
DA	Dopamina
DALY	Anys de vida ajustats per discapacitat
DAT1	Transportador de dopamina 1
DBH	Dopamina beta hidroxilasa
DDC	Dopa descarboxilasa
DIRAS2	GTPasa de la família DIRAS membre 2
DMN	Xarxa neuronal per defecte
DNM1	Dinamina 1
DPP10	Peptidasa dipeptidil 10
DRD1	Receptor de dopamina 1
DRD2	Receptor de dopamina 2
DRD3	Receptor de dopamina 3
DRD4	Receptor de dopamina 4
DRD5	Receptor de dopamina 5
DSM	Manual Diagnòstic i Estadístic dels Trastorns Mentals V (<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>)
EMP2	Proteïna de membrana epitelial 2
eQTLs	Loci de trets quantitius d'expressió
EXP5	Exportina 5
FADS2	Desaturasa d'àcids grassos 2
FBXO33	Proteïna amb caixa F 33
FGF1	Factor de creixement fibroblàstic 1
FTO	Associat a obesitat i massa greixosa
GABA	Àcid gamma-aminobutíric
GAD2	Glutamat descarboxilasa 2
GFOD1	Glucosa-fructosa oxidoreductasa domini 1
GPC6	Glipicà 6

GPR139	Receptor acoplat a proteïna G 139
GPRC5B	Receptor acoplat a proteïna G class C grup 5 membre B
GRIN2A	Receptor ionotròpic de glutamat N-metil D-aspartat 2A
GRM5	Receptor metabotròpic de glutamat 5
GRM7	Receptor metabotròpic de glutamat 7
GWAS	Estudi d'associació a escala genòmica
HAS3	Hialuronan sintasa 3
HES1	Factor de transcripció bhlh família Hes membre 1
HTR1A	Receptor de serotonina 1A acoplat a proteïna G
HTR1B	Receptor de serotonina 1B acoplat a proteïna G
HTR1E	Receptor de serotonina 1E acoplat a proteïna G
HTR2A	Receptor de serotonina 2A acoplat a proteïna G
HTR2C	Receptor de serotonina 2C acoplat a proteïna G
HTR3A	Receptor de serotonina 3A ionotròpic
HTR3B	Receptor de serotonina 3B ionotròpic
ICASA	Col·laboració Internacional sobre TDAH i Abús de Substàncies (<i>International Collaboration on ADHD and Substance Abuse</i>)
ICD	Classificació Internacional de Malalties 10 (<i>International Classification of Diseases</i>)
IL20RA	Receptor d'interleuquina 20 alfa
IMAGE	Consorci Multicèntric Internacional de Genètica del TDAH (<i>International Multicenter ADHD Genetics</i>)
IMpACT	Col·laboració Multi-Cèntrica Internacional del TDAH Persistent (<i>International Multi-centre persistent ADHD CollaboraTion</i>)
ITGAE	Integrina alfa E
KALRN	Kalirina
Kb	Kilobase
KCNC1	Canal de potassi dependent de voltatge família C membre 1
KCNIP1	Proteïna interactuant del canal de potassi dependent de voltatge 1
KCNIP4	Proteïna interactuant del canal de potassi dependent de voltatge 4
LC	Locus coeruleus
LD	Desequilibri de lligament
LPHN3	Latrofilina 3
MAN2A2	Manosidasa alfa 2A membre 2
MAO	Monoamina oxidasa

MAOA	Monoamino oxidasa A
MAOB	Monoamino oxidasa B
Mb	Megabase
MBD	Disfunció Cerebral Mínima
MHPG	3-metoxi-4-hidroxifeniletilnglicol
MMP24	Metalopeptidasa de matriu 24
MMP7	Matrix metallopeptidase 7
MPTP	1-metil-4-fenil-1236-tetrahidropiridina
NE	Norepinefrina
NET1	Transportador de norepinefrina 1
NHE9	Intercanviador de NA ⁺ /H ⁺
NOS1	Sintasa d'òxid nítric 1
NTF3	Neurotrofina 3
NTRK2	Receptor neurotròfic tirosin quinasa 2
OMS	Organització Mundial de la Salut
PARK2	Parkina 2
PCB	Bifenils policlorinats
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
RTqPCR	Reacció en cadena de la polimerasa quantitativa a temps real
PGC	Consorci de Genòmica en Psiquiatria (<i>Psychiatric Genomics Consortium</i>)
PNMT	Feniletanolamina-N-metiltransferasa
POLR2A	ARN polimerasa II subunitat A
PRKG1	Proteïna quinasa CGMP-depenent 1
CoCA	Condicions comòrbides del TDAH
PRS	Puntuacions de risc poligènic
PTGDS	Prostaglandina-D2-sintasa
RISC	Complex silenciador induït d'ARN
RM	Ressonància magnètica
ROI	Regió d'interès
SHR	Rata hipertensa espontània
SLC18A2	Transportador de soluts família 18 membre 2
SLC1A3	Transportador de soluts família 1 membre 3
SLC5A7	Transportador de soluts família 5 membre 7

SLC6A2	Transportador de soluts família 6 membre 2
SLC6A3	Transportador de soluts família 6 membre 3
SLC6A4	Transportador de soluts família 6 membre 4
SLC9A9	Transportador de soluts família 9 membre 9
SNAP25	Proteïna associada al sinaptosoma 25
SNARE	Receptor de proteïna d'ancoratge del factor soluble sensible a N-etilmaleimida
SNP	Polimorfismes de nucleòtid únic
SPOCK3	SPARC/osteonectina proteoglicà de domini similar cwcv i kazal 3
STX1A	Sintaxina 1A
TUS	Trastorns per Ús de Substàncies
SYP	Sinaptofisina
SYT1	Sinaptotagmina 1
SYT2	Sinaptotagmina 2
TCERG1L	Transcription elongation regulator 1-like
TDA	Trastorn per Dèficit d'Atenció
TDAH	Trastorn per Dèficit d'Atenció amb Hiperactivitat
TH	Tirosina hidroxilasa
TPH1	Triptòfan hidroxilasa 1
TPH2	Triptòfan hidroxilasa 2
TRIM32	Contenedor de motiu tripartit 32
TRIM71	Contenedor de motiu tripartit 71
TRIO	Factor intercanviador de nucleòtids guanina Rho Trio
UP	Ubiquitina-Proteosoma
UTR	Regions no codificants
VAMP2	Proteïna de membrana associada a vesícules 2
WASL	Similar a la síndrome Wiskott-Aldrich
WKY	Rata Wistar Kyoto

INTRODUCCIÓ

1. Introducció al TDAH

1.1. Clínica del TDAH

1.1.1. Simptomatologia

El **Trastorn per Dèficit d'Atenció amb Hiperactivitat** (TDAH) és un trastorn del **neurodesenvolupament** que s'inicia a l'edat infantil i que es caracteritza per un patró persistent d'excessiva **inatenció**, **hiperactivitat motora** i **impulsivitat** que generen disfuncionalitat en dos o més àrees de la vida de l'individu (Warikoo i Faraone, 2013; Thapar i Cooper, 2016). La inatenció es pot manifestar com a distractibilitat, ensomniació o problemes de planificació i organització; la hiperactivitat pot expressar-se com a inquietut motora, constant moviment de mans i peus o excessiva parla; i la impulsivitat pot presentar-se com a irreflexibilitat, precipitació en la conducta i falta d'anticipació de les conseqüències dels actes, el que contribueix a l'aparició de conflictes i accidents (Ramos-Quiroga *et al.*, 2012). Addicionalment, el TDAH també s'associa a trets d'**inestabilitat emocional**, que es pot entendre com la incapacitat per modular les respostes emocionals, donant lloc a respostes extremes de natura interna o externa i que es consideren inapropiades per a l'edat de desenvolupament de l'individu (Surman *et al.*, 2011; Biederman *et al.*, 2012; van Stralen J, 2016). Tot i que des de fa anys es reconeix que els infants amb TDAH mostren una baixa tolerància a la frustració i un comportament explosiu, aquests símptomes no constitueixen criteris diagnòstics del TDAH degut a què també es poden observar en altres trastorns (Willcutt *et al.*, 2005; American Psychiatric Association, 2013).

Com a conseqüència de tot aquest conjunt de símptomes i alteracions, els individus amb TDAH poden desenvolupar de forma secundària inflexibilitat i poca capacitat d'adaptació, conducta explosiva, memòria de treball reduïda o baixa autoestima derivada del fracàs escolar i el rebuig dels companys (Warikoo i Faraone, 2013). Així, el trastorn s'associa a dèficits cognitius, acadèmics, conductuals, emocionals i socials, així com a una elevada comorbiditat amb altres trastorns psiquiàtrics (Warikoo i Faraone, 2013; Thapar i Cooper, 2016). Per tant, el TDAH es un trastorn complex que es caracteritza per una marcada **heterogenia clínica**, **etiològica** i **fisiopatològica**, de tal manera que els individus diagnosticats amb aquest trastorn difereixen els uns dels altres en relació a la combinació dels símptomes principals, el nivell de dèficits i comorbiditat, o en altres factors subjacents individuals, familiars o socials (Warikoo i Faraone, 2013; Thapar i Cooper, 2016).

1.1.2. Diagnòstic i classificació

El TDAH constitueix una categoria diagnòstica en la quarta i cinquena (vigent) edicions del Manual Diagnòstic i Estadístic dels Trastorns Mentals (*DSM - Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*), elaborat per l'Associació Americana de Psiquiatria (American Psychiatric Association, 1994, 2013). A nivell europeu, el diagnòstic equivalent correspon a "Trastorn Hipercinètic", definit a la Classificació Internacional de Malalties 10 (*ICD - International Classification of Diseases*), elaborada per l'Organització Mundial de la Salut (OMS) (World Health Organization, 1992; Lange *et al.*, 2010).

Els individus amb TDAH reclutats per a la realització d'aquest treball han estat avaluats i diagnosticats en base als criteris definits a la versió revisada del DSM-IV (DSM-IV-TR) (American Psychiatric Association, 2000). La classificació i diagnòstic d'aquest trastorn segons aquest manual es basa en la descripció dels símptomes en funció una sèrie d'ítems i en el còmput del total d'aquests ítems-símptomes en les dimensions d'inatenció i hiperactivitat/impulsivitat (Taula 1). Els criteris definits en el DSM-IV-TR permeten la classificació de tres subtipus clínics de TDAH: el subtipus **combinat**, el predominantment **inatent** i el predominantment **hiperactiu/impulsiu**. El diagnòstic del subtipus combinat requereix la presència d'un mínim de sis ítems, d'un total de nou, tant del domini de la inatenció com del domini de la hiperactivitat/impulsivitat, mentre que la forma inatenta ha d'acomplir únicament sis símptomes de l'àmbit de la inatenció; i la forma hiperactiva/impulsiva, sis símptomes del domini hiperactiu i impulsiu. El diagnòstic de TDAH requereix que aquests símptomes es presentin en dos o més àrees de la vida -per exemple a casa, i a l'escola o la feina-, i han d'existir evidències clares que causen dèficits funcionals en l'àmbit acadèmic, social o ocupacional de l'individu. L'aparició del trastorn ha de produir-se durant l'edat infantil, previ als set anys, segons els criteris definits al DSM-IV-TR. Addicionalment, també es recull la possibilitat de la remissió parcial de la simptomatologia en l'adult i es parla de **TDAH residual** quan un individu amb TDAH des de la infància no compleix la totalitat dels criteris diagnòstics a l'edat adulta, però sí presenta un nivell significatiu de disfunció i malestar derivat de la simptomatologia romanent.

En comparació amb el DSM-IV-TR, el DSM-V incorpora tres canvis importants: primer, incrementa l'edat d'aparició de la malaltia de set a dotze anys; segon, s'inclouen eines oficials pel diagnòstic específic del TDAH en l'adolescent i l'adult reduint el llistat de símptomes de sis ítems a cinc per a individus a partir de 17 anys; i tercer, permet el diagnòstic de TDAH en presència de trastorns de l'espectre autista, fet que abans suposava un criteri d'exclusió. Aquesta darrera modificació és

consistent amb la nova conceptualització del TDAH com a trastorn del neurodesenvolupament. Un altre canvi que incorpora el DSM-V respecte a les edicions anteriors és la substitució del concepte de “subtipus” clínics de TDAH per la definició de “presentacions”, les quals, explícitament, no s’espera que siguin estables, ja que reflecteixen el fet que els símptomes poden experimentar una evolució longitudinal al llarg de la vida, de manera que un individu pot arribar a canviar la seva presentació de TDAH amb la progressió del trastorn (Lahey *et al.*, 2005; American Psychiatric Association, 2013).

Tot i que la definició categòrica del TDAH resulta útil a la pràctica clínica, aquest trastorn també es pot entendre com un fenotip continu en termes de causes i conseqüències, de manera que tot i que existeixi un llindar definit a partir del qual s’aplica o no el diagnòstic, els individus que presenten símptomes per sota d’aquest límit també poden presentar dèficits funcionals i estar en risc de patir conseqüències adverses (Thapar i Cooper, 2016).

1.1.3. Evolució al llarg de la vida

Fins fa relativament poc temps, es considerava que el TDAH no es manifestava més enllà de l’adolescència, de manera que posteriorment es produïa una remissió del trastorn o desembocava en altres patologies, com ara els trastorns de la personalitat. Tanmateix, estudis realitzats a partir de finals dels anys seixanta van demostrar la persistència dels símptomes en una part significativa dels adults diagnosticats de TDAH a la infantesa, posant de manifest la **cronicitat del trastorn** (Quitkin i Klein, 1969; Borland *et al.*, 1976). S’han establert com a predictors infantils del TDAH en l’edat adulta la presència de subtipus combinat, major intensitat dels símptomes, depressió o ansietat comòrbides, antecedents familiars de TDAH, major adversitat social i psicopatologia parental (Lara *et al.*, 2009; Kooij *et al.*, 2010). L’abordatge de la història natural del TDAH mitjançant estudis prospectius longitudinals ha permès examinar l’evolució del trastorn al llarg de la vida i determinar que, com a trastorn del neurodesenvolupament, els trets característics i definitoris del TDAH tendeixen a declinar amb l’edat (Biederman *et al.*, 2000; Faraone *et al.*, 2006a; Young i Gudjonsson, 2008). No obstant, en línia amb l’heterogènia clínica que presenta el TDAH, les trajectòries evolutives del trastorn són molt variables. El conjunt de símptomes de la dimensió de la inatenció són els que presenten una major persistència temporal, aproximadament del 80%, mentre que els símptomes que defineixen la impulsivitat presenten una continuïtat intermitja, al voltant del 60%. En canvi, els trets característics del domini de la hiperactivitat són els més làbils al llarg del temps, els que més s’adapten o remeten, i només es mantenen en el 50% dels individus adults, aproximadament (Hart *et al.*, 1995; Biederman *et al.*, 2000).

Taula 1. Criteris definits per al diagnòstic del TDAH segons el DSM-IV-TR.

A. Es compleixi 1 ó 2:

- 1. Sis (o més) dels següents símptomes d'inatenció han persistit com a mínim durant sis mesos amb una intensitat que és inadaptativa i incoherent al nivell de desenvolupament:**

Inatenció

- (a) Sovint no para atenció suficient als detalls o comet errors per distracció en les tasques escolars, la feina o en altres activitats.
- (b) Sovint té dificultats per mantenir l'atenció en tasques o activitats lúdiques.
- (c) Sovint sembla no escoltar quan se'l parla directament.
- (d) Sovint no segueix les instruccions i no finalitza les tasques escolars, encàrrecs o obligacions en el lloc de treball (no es deu a comportament negativista o a incapacitat per a comprendre instruccions).
- (e) Sovint té dificultats per organitzar tasques i activitats.
- (f) Sovint evita, el desagrada o és reticent a dedicar-se a tasques que requereixen un esforç mental sostingut (com ara treballs escolars o domèstics).
- (g) Sovint extravia objectes necessaris per a tasques o activitats (p. ex. joguines, exercicis escolars, llapis, llibres o eines).
- (h) Sovint es distreu fàcilment per estímuls irrelevantes.
- (i) Sovint es descuidat en les activitats diàries.

- 2. Sis (o més) dels següents símptomes d'hiperactivitat-impulsivitat han persistit com a mínim durant 6 mesos amb una intensitat inadaptativa i incoherent en relació al nivell de desenvolupament:**

Hiperactivitat

- (a) Sovint mou en excés mans o peus, o es mou en el seu seient.
- (b) Sovint abandona el seu seient a classe o en altres situacions en les que s'espera que romangui assegut.
- (c) Sovint corre o salta excessivament en situacions en les que és inapropiat fer-ho (en adolescents i adults pot limitar-se a sentiments subjectius d'inquietud).
- (d) Sovint té dificultats per jugar o dedicar-se tranquil·lament a activitats d'oci.
- (e) Sovint "està en marxa" o sol actuar com si tingués un motor.
- (f) Sovint parla en excés.

Impulsivitat

- (g) Sovint precipita respostes abans d'haver-se completat les preguntes.
- (h) Sovint té dificultats per a guardar el torn.
- (i) Sovint interromp o s'immisceix en les activitats dels altres (p. ex. s'interposa en converses o jocs).

- B. Alguns símptomes d'hiperactivitat-impulsivitat o inatenció que causen alteracions estaven presents abans dels set anys d'edat.**

- C. Algunes de les alteracions provocades pels símptomes són presents en dos o més ambients (p. ex. en l'escola (o la feina) i a casa).**

- D. Han d'existir proves clares d'un deteriorament clínic significatiu de l'activitat social, acadèmica o laboral.**

- E. Els símptomes no apareixen exclusivament en el transcurs d'un trastorn generalitzat del desenvolupament, esquizofrènia o un altre trastorn psicòtic, i n'expliquen millor per la presència d'un altre trastorn mental (p. ex. trastorn de l'estat d'ànim, trastorn d'ansietat, trastorn dissociatiu o un trastorn de la personalitat).**

Trastorn per dèficit d'atenció amb Hiperactivitat, tipus combinat:

Si se satisfan els Criteris A1 i A2 durant els últims 6 mesos.

Trastorn per dèficit d'atenció amb Hiperactivitat, tipus amb predomini del dèficit d'atenció

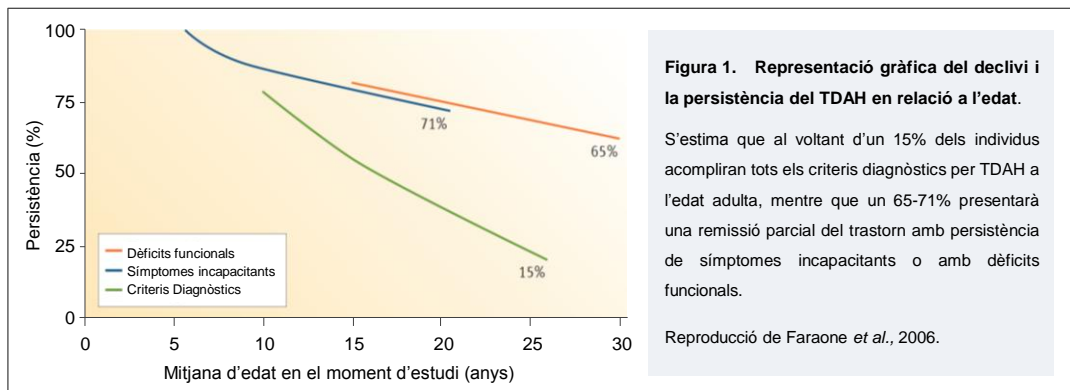
Si se satisfan els Criteri A1, però no el A2 durant els últims 6 mesos.

Trastorn per dèficit d'atenció amb Hiperactivitat, tipus amb predomini hiperactiu-impulsiu

Si se satisfan els Criteri A2, però no el A1 durant els últims 6 mesos.

Nota de codificació. En el cas dels subjectes (en especial adolescents i adults) que actualment tinguin símptomes que ja no compleixen tots els criteris, ha d'especificar-se en "remissió parcial".

Actualment, s'estima que tot i que la majoria d'infants amb TDAH no compliran la totalitat dels criteris diagnòstics a l'edat adulta, la persistència parcial de símptomes incapacitants per sota del llindar diagnòstic o la presència de dèficits funcionals severes, és significativament elevada en l'adult (Faraone *et al.*, 2006a). En funció de l'evolució del trastorn i el grau de persistència dels símptomes i dèficits funcionals, es poden diferenciar tres manifestacions en l'adult: el **TDAH persistent**, el **TDAH en remissió parcial** i el **TDAH en remissió total** (Young i Gudjonsson, 2008). Tot i que el consens no és complet, s'estima que un 15% dels individus diagnosticats de TDAH a la infantesa presentaran un fenotip de persistència total i compliran tots els criteris diagnòstics a l'edat adulta, mentre que si es consideren les formes de remissió parcial, amb persistència de símptomes incapacitants o amb dèficits funcionals, la persistència del trastorn s'eleva fins al 71% i el 65%, respectivament (Figura 1) (Faraone *et al.*, 2006a).



Per tant, les diferències en els criteris diagnòstics del TDAH, segons si es basen en el concepte sindròmic o en una definició simptomàtica, estarien condicionant significativament les estimacions de persistència del trastorn en l'adult i explicarien la variabilitat observada entre estudis (Biederman *et al.*, 2000). En aquest sentit, s'ha suggerit que el concepte de remissió del trastorn amb l'edat no respondria a la seva evolució natural, sinó que seria un artefacte dels criteris diagnòstics del DSM-IV i el DSM-IV-TR, que no relaxarien de forma adequada els canvis que es produeixen en el TDAH al llarg de la vida. Aquest fet que s'ha redreçat en el DSM-V, mitjançant la definició de nous criteris diagnòstics, el que pot afectar les estimacions de la prevalença del trastorn, d'una forma insubstancial a la població infantil, però amb un major impacte en l'adult (American Psychiatric Association, 1994, 2000 i 2013; McGough i Barkley, 2004; Faraone *et al.*, 2006a; Polanczyk *et al.*, 2010; Matte *et al.*, 2015).

1.1.4. Comorbiditat

Una altra dimensió clínica important de l'heterogènia que caracteritza el TDAH és la **comorbiditat psiquiàtrica**, que afecta tant la població infantil com l'adult. Amb una distribució contínua, l'afectació comprèn des d'un extrem, amb una baixa proporció de població clínica de TDAH sense comorbiditats, a l'altre extrem, amb individus que presenten un patró complex amb múltiples trastorns comòrbids. Es calcula que entre un 50-70% de la població infantil amb TDAH pateix, com a mínim, un altre trastorn psiquiàtric -el que implica que es presenta més freqüentment amb alguna comorbiditat que de forma aïllada-, i s'estima que prop d'un 20% presentaria tres o més comorbiditats, així com un increment del risc de patir dèficits funcionals i requerir recursos sanitaris i educatius proporcional al número de trastorns (Larson *et al.*, 2011; Jensen i Steinhausen, 2015). Els estudis realitzats suggereixen que les comorbiditats més habituals del TDAH a la infantesa inclouen els trastorns de la conducta (9,9-50%), trastorn negativista desafiant (45-67%), trastorns de l'aprenentatge (15,4-60%), trastorns de la son (25-70%), trastorns de l'ansietat (1,3-50%) i trastorn depressiu major (1,6-31%). A més, degut a la seva elevada morbiditat, també cal esmentar la comorbiditat del TDAH amb el trastorn bipolar (0-22%), trastorns del neurodesenvolupament com els trastorns de l'espectre autista (2-52%), i trastorns per abús/dependència a substàncies (TUS; 1,2-50%, incloent adolescents) (Spruyt i Gozal, 2011; Singh *et al.*, 2006; Mulligan *et al.*, 2009; Larson *et al.*, 2011; Faraone *et al.*, 2012; Leitner Y, 2014; Jensen i Steinhausen, 2015; Singh *et al.*, 2015; Clemow *et al.*, 2017). Cal destacar que, independentment de la persistència del trastorn, diversos estudis demostren que els infants amb TDAH presenten una major freqüència de trastorns psiquiàtrics a l'edat adulta, que no havien estat presents a la infantesa, com ara ansietat, trastorn depressiu major, TUS i trastorns antisocials (Manuzza *et al.*, 1997; Barkley *et al.*, 2004).

Pel que fa a la comorbiditat del TDAH en l'adult, es considera que entre el 50 i el 89% presenta un o més trastorns psiquiàtrics agregats, i que al voltant d'un 33% en presenta dos o més, fet que dona lloc a alteracions clíniques additives que provoquen dèficits funcionals globals, amb pitjors conseqüències clíniques, major resistència al tractament i una major despesa socioeconòmica associada al trastorn. Alguns dels trastorns psiquiàtrics comòrbids més freqüents en l'adult amb TDAH inclouen trastorn depressiu major (11-55%), trastorn bipolar (0-47%), trastorns de l'ansietat (2,9-59%), trastorns de la son (26%), trastorn antisocial de la personalitat (12-23%), trastorns de l'espectre autista (10-38,8%) i TUS (21-47%) (Sobanski E, 2006 i 2007; Kooij *et al.*, 2012; Warikoo i Faraone, 2013; Singh *et al.*, 2015; Antshel *et al.*, 2016; Wingo i Ghaemi; 2007; Reiersen *et al.*, 2007; Clemow *et al.*, 2017).

Adicionalment, diversos estudis han demostrat l'existència d'un patró diferencial de comorbiditat en els diferents subtipus clínics de TDAH, sent el subtipus combinat el més associat a trastorns comòrbids, els més freqüents dels quals serien els trastorns de l'ànim, l'ansietat, els TUS i el trastorn antisocial de la personalitat (Sprafkin *et al.*, 2007; Sobanski *et al.*, 2008; Cumyn *et al.*, 2009; Wilens *et al.*, 2009). Per altra banda, també s'han observat diferències en els patrons de comorbiditat del TDAH en funció del sexe de l'individu, on els homes presentarien a la infantesa una major comorbiditat amb trastorns de la conducta, com ara el trastorn disocial o el trastorn negativista desafiant, i en l'adult, amb TUS i trastorn antisocial de la personalitat (Biederman *et al.*, 2004; Sprafkin *et al.*, 2007).

Altres estudis han examinat també la relació inversa i han estimat l'ocurrència de TDAH en individus amb altres trastorns psiquiàtrics. Aquests estudis han demostrat que existeix un nombre significatiu d'individus amb TUS, trastorns de l'espectre autista, trastorns de l'ànim i trastorns de l'ansietat que també presentarien TDAH (Sobanski E., 2006; Kooij *et al.*, 2012).

1.2. Conceptualització històrica del TDAH i la seva simptomatologia

Tot i que existeix certa tendència a considerar que la conceptualització i el diagnòstic del TDAH constitueixen una invenció moderna que respon a l'ànim mercantilista de la indústria farmacèutica, la presència de referències contínues des d'abans del segle V a.C. constatant l'existència d'individus amb símptomes d'inatenció, facilitat per distreure's i hiperactivitat, posa en evidència que aquest trastorn és una entitat que ha estat present al llarg de la història.

El primer informe on es fa referència a una condició comparable al concepte actual de TDAH, data del 493 a.C. i va ser realitzat per Hipòcrates. En ell, descriu pacients caracteritzats per *“respostes ràpides a experiències sensorials, però també menys tenaces, degut a què l'ànima es mou ràpidament vers la següent impressió”* (Hipòcrates: Adams F, 1849; Martínez-Badía i Martínez-Raga, 2015). Altres registres històrics, com textos literaris o obres d'art, també evidencien la coexistència del trastorn amb l'humà al llarg de la història. El dramaturg William Shakespeare va incloure un personatge amb *“malaltia de la inatenció”* a la obra “El Rei Henry VIII”, i en diversos contes escrits pel psiquiatra i poeta Heinrich Hoffmann, es descriuen infants amb comportaments disruptius -com en *“Fidgety Philip”*- que actualment podrien ser diagnosticats de TDAH (Taula 2; Figura 2) (Higg i Barkley, 1992; Thome i Jacobs, 2004).

La història moderna de la descripció mèdica que assimila el TDAH actual es remunta més de 200 anys enrere. Els primers informes mèdics que descriuen infants i adults amb nivells inadequats d'atenció i


distracció daten del 1775 i pertanyen al físic Melchior Adam Weikard, que va anomenar el trastorn “*dèficit d’atenció*” (Barkley i Peters, 2012; Weikard MA, 2013). Poc després, el 1798, Alexander Crichton va descriure la “*malaltia de l’atenció*”, que es caracteritzava per “*nivells alterats d’inatenció i distracció, i incapacitat per atendre amb el grau de constància necessari qualsevol objectiu, i que s’associava a nivells inusuals d’impulsivitat, inquietud i inestabilitat emocional*” (Crichton A, 1798) (Taula 2).

Taula 2. Exemples de la terminologia emprada al llarg de la història previ al Segle XX per a descriure els símptomes d’inatenció, hiperactivitat i impulsivitat, compatibles amb el concepte actual de TDAH.

Autor	Data	Descripció
Hipòcrates de Kos	493 a.C.	Desequilibri del foc sobre l’aigua que causa respostes ràpides a experiències sensorials, però menys tenaces, degut a què l’ànima es mou ràpidament vers la següent impressió.
Galè de Pèrgam	S. II d.C.	Problemes en la composició i connexió entre la ment i el cos a través de l’ànima (o <i>pneuma</i>).
William Shakespeare	1613	Malaltia de la inatenció
Melchior Adam Weikard	1775	Dèficit d’atenció (“Mangel der Aufmerksamkeit” o “Attentio volubilis”)
Alexander Crichton	1798	Malaltia de l’atenció
Benjamin Rush	1812	Síndrome que es caracteritza per la inhabilitat de focalitzar l’atenció.
Charles West	1848	Infant nerviós
Heinrich Neumann	1859	Hipermetamorfoosi
Désiré-Magloire Bourneville	1885	Inestabilitat mental
William James	1890	Voluntat explosiva
Thomas Clifford Albutt	1892	Sistema nerviós inestable
Sir Thomas Smith Clouston	1899	Infants neuròtics amb hiperexcitabilitat simple
Sir George Frederic Still	1902	Defectes anormals del control moral

Durant el segle XIX, majoritàriament en forma de casos clínics, es troben importants referències compatibles amb la descripció actual del TDAH. El 1812, el físic Benjamin Rush va descriure una síndrome que es caracteritzava per “*la inhabilitat de focalitzar l’atenció*”, i el 1848, el pediatra Charles West va descriure “*l’infant nerviós*” (Rush B, 1812; West G, 1848). El 1859, Heinrich Neumann va introduir el terme “*hipermetamorfoosi*” per referir-se a infants “*incapaços d’estar centrats, amb inclinacions volàtils, nerviosos i en moviment continu, incapaços de quedar-se quiets i amb dificultats per arribar a asseure’s*” (Neumann H, 1859). També es va anomenar “*sistema nerviós inestable*”, “*la voluntat explosiva*” o els “*infants neuròtics*”, que presentaven “*hiper-excitabilitat, hiper-sensitivitat i explosivitat mental*” (Albutt TC, 1892; Bourneville E, 1897; James W, 1890; Clouston TS, 1899) (Taula 2). Tanmateix, no va ser fins el 1902 que Sir George Frederic Still va publicar la primera descripció científico-clínica de 43 individus que presentaven “*defectes anormals del control moral*”, un concepte que descriu diferents comportaments alterats en infants, entre els que es podrien incloure subjectes amb TDAH (Still GF, 1902). En la seva publicació, va desvincular els símptomes de retard mental d’aquesta condició, i va proposar una connexió entre la presència de danys cerebrals a la infància primerenca i

l'aparició posterior de comportament disruptiu. Aquesta idea va ser força influent i va suposar l'origen de les conceptualitzacions posteriors -i precursors històrics- del TDAH (Still GF, 1902; Lange *et al.*, 2010; Martínez-Badía i Martínez-Raga, 2015) (Taula 2). Els estudis d'aquest pediatra anglès van constituir un punt d'inflexió en la conceptualització del TDAH i són considerats el punt d'inici històric d'aquest trastorn.

<p>Figura 2. Fragment del poema "The Story of Fidgety Philip", del llibre <i>Struwwelpeter: Merry Tales and Funny Pictures</i>, escrit per Heinrich Hoffmann, el 1845.</p> <p>Descriu un infant amb conducta disruptiva compatible amb el concepte actual de TDAH.</p>	<p><i>"Let me see if Philip can Be a little gentleman; Let me see if he is able To sit still for once at table." Thus spoke, in earnest tone, The father to his son; And the mother looked very grave To see Philip so misbehave. But Philip he did not mind His father who was so kind.</i></p>	 <p><i>He wriggled And giggled, And then, I declare, Swung backward and forward And tilted his chair, Just like any rocking horse;- "Philip! I am getting cross!" See the naughty, restless child, Growing still more rude and wild, Till his chair falls over quite. (...)</i></p>
---	--	--

Més tard, es va descriure el "*Trastorn Post-Encefalític de la Conducta*", una condició que incloïa símptomes característics del TDAH i altres comportaments que també podrien ser atribuïts al trastorn, com ara conducta desafiant, impulsivitat o hiperactivitat (Ebaugh FG, 1923; Strauss i Lehtinen, 1947; Lange *et al.*, 2010). D'aquí sorgí el concepte de "*lesió cerebral mínima*" i la noció que les lesions cerebrals podien ser la causa del comportament hiperactiu (Kessler JW, 1980). Tanmateix, el 1932, els físics Franz Kramer i Hans Pollnow van descriure la "*Malaltia Hiperkinètica de la Infància*" i van advertir que els símptomes d'aquest trastorn ja havien estat descrits, però emmascarats per altres entitats com ara els efectes residuals de l'encefalitis letàrgica epidèmica (Kramer i Pollnow, 1932; Lange *et al.*, 2010). En la mateixa línia, Laufer i el seu equip van descriure el "*Trastorn de l'Impuls Hiperkinètic*" en infants que no presentaven cap factor etiològic traumàtic o infecció, pel que van proposar com a causa l'alteració funcional del cervell (Denhoff *et al.*, 1957). D'aquesta manera, es va reemplaçar el terme "*dany cerebral mínim*" per "*disfunció cerebral mínima*" (MBD), distingint aquells infants amb MBD i un rang normal d'intel·ligència, dels individus amb lesions cerebrals i discapacitat intel·lectual (Rothenberger i Neumärker, 2005; Lange *et al.*, 2010). També es va diferenciar entre els trets d'incapacitat per "*controlar l'atenció, els impulsos i la funció motora*", i es va establir el concepte dels tres símptomes definitoris del TDAH, la **inatenció**, la **impulsivitat** i la **hiperactivitat** (Clements SD, 1966; Lange *et al.*, 2010). No obstant, més endavant, el terme MBD també va ser qüestionat i va ser substituït per altres més objectius, específics i descriptius, com ara "*hiperactivitat*" o "*alteracions de l'aprenentatge*". Finalment, el 1968 es va incorporar la primera definició del concepte d'hiperactivitat a la nomenclatura de diagnòstic oficial, reflectida en el **DSM-II** sota el nom de "*Reacció Hiperkinètica de la Infància*" (American Psychiatric Association, 1968).

Durant els anys setanta, va créixer l'interès pels símptomes de control de l'atenció i dels impulsos, que van rellevar la importància a la hiperactivitat. Aquest fet es va plasmar en la publicació de la tercera versió del DSM (**DSM-III**), on el trastorn va ser anomenat "*Trastorn per Dèficit d'Atenció*" (TDA) -amb o sense hiperactivitat- (Douglas VI, 1972; American Psychiatric Association, 1980). Tanmateix, aquesta definició va provocar certa controvèrsia i, el 1987, es va publicar una versió revisada (**DSM-III-R**) on el trastorn es va re-anomenar "*Trastorn per Dèficit d'Atenció amb Hiperactivitat*" (TDAH) (American Psychiatric Association, 1987). Durant els anys vuitanta i noranta les evidències aportades per diferents estudis van conduir a recuperar les interpretacions històriques sobre les lesions cerebrals i les alteracions funcionals en el TDAH, i es va demostrar que el trastorn no afectava exclusivament a infants, sinó que es tractava d'una condició crònica que, en molts casos, persistia en l'edat adulta (Döpfner *et al.*, 2000; Lange *et al.*, 2010; Matthews *et al.*, 2014). A més, es va recuperar el concepte de les dues dimensions del trastorn en el que es diferenciaven els símptomes relacionats amb la inatenció, dels del domini hiperactiu-impulsiu, i es van definir els tres subtipus clínics de TDAH: predominantment inatent, predominantment hiperactiu-impulsiu i combinat (Achenbach i Edelbrock, 1983; Lahey *et al.*, 1988; Lahey *et al.*, 1994). Aquesta nova categorització del TDAH, així com l'acreditació del diagnòstic en l'adult -mitjançant la inclusió d'exemples adaptats-, es va incloure al **DSM-IV**, i es va mantenir en la versió revisada (**DSM-IV-TR**) (American Psychiatric Association, 1994 i 2000). El 2013 es va publicar la cinquena edició (**DSM-V**), en la que, com ja s'ha comentat, s'actualitzava la descripció clínica del trastorn, es milloraven els criteris diagnòstics i es mantenia la distinció dels dos dominis simptomàtics del TDAH, la validesa i utilitat clínica dels quals havia estat recolzada per diverses evidències. A diferència de l'anterior, en el **DSM-V**, el TDAH es defineix com a "trastorn del neurodesenvolupament" i es proporcionen eines oficials pel diagnòstic específic del TDAH en l'adolescent i l'adult (American Psychiatric Association, 2013; Willcutt *et al.* 2012; Fair *et al.*, 2013; Thapar i Cooper, 2016).

Per concloure, tot i que la terminologia emprada al llarg de la història per a descriure els trets característics del TDAH ha estat molt abundant i heterogènia, els símptomes d'aquest trastorn no són de recent aparició, sinó que probablement han estat presents des dels inicis de la humanitat i han patit profunds canvis conceptuals i de percepció a mesura que l'entorn ha anat evolucionant i que l'humà s'ha hagut d'adaptar a noves situacions i dinàmiques socials. Això ha fet que la connotació projectada cap a aquestes característiques hagi estat més o menys positiva en funció del context històric de cada moment, passant del concepte del lloat conquistador impulsiu, a l'infant inquiet amb fracàs escolar. En cada situació, l'adaptació de l'individu al seu entorn és el que finalment ha determinat si la presència d'aquests símptomes era considerava una qualitat o una disfunció. Per exemple, s'especula que

diverses figures històriques podrien haver tingut dificultats d'aprenentatge i atenció, així com altres símptomes atribuïbles a la conceptualització actual del TDAH (Figura 3).





	<p>L'Apòstol Pere (Segle I a.C.- 67 d.C.) era conegut per la seva impulsivitat, els comentaris irreflexius, l'elevada reactivitat i la seva conducta impetuosa i temperamental. Fets com dur sempre l'arma en alça, parlar de forma intrusiva i fer sovint promeses que no podia acomplir, revelen un home imprudent i sense capacitat de previsió.</p>		<p>Wolfgang Amadeus Mozart (1756 - 1791) composava i recordava peces musicals senceres, però li desagradava la tediosa tasca i l'atenció que suposava transcriure al detall les seves composicions en paper. A la seva correspondència, mencionava la seva disminuïda capacitat per concentrar-se.</p>
	<p>Ben Franklin (1706 – 1790) va fracassar a l'escola degut al seu perfeccionisme i la seva conducta impulsiva. Impulsivitat, com la d'anar sota una tempesta amb una clau en un estel i esperar que hi caigui un llamp. Més tard, va aprendre cinc idiomes de forma autodidacte i se'l va respectar com a escriptor, científic, inventor i home de negocis.</p>		<p>Albert Einstein (1879 – 1955) era conegut per somiar despert a l'escola i per ser molt oblidatís. Un professor li va dir que no arribaria mai enlloc. Per altra banda, es podia passar hores i, fins i tot, dies assegut tranquil·lament fent "experiments mentals", incloent series complexes de càlculs matemàtics i revisions.</p>

Figura 3. Exemples de figures històriques que presentaven trets conductuals compatibles amb la simptomatologia clínica del TDAH.

1.3. Epidemiologia

1.3.1. Prevalença infantil i adulta

El TDAH constitueix un dels trastorns psiquiàtrics més freqüents de la infantesa, amb estimacions de la prevalença global que comprenen de l'1 a gairebé el 20% de la població (Bird H, 2002; Faraone *et al.*, 2003; Skounti *et al.*, 2007; Warikoo i Faraone, 2013; Singh *et al.*, 2015). Aquesta marcada variabilitat s'atribueix a la influència de múltiples factors, que inclouen l'edat i el sexe, factors socioculturals i demogràfics, el subtipus de TDAH i factors metodològics com l'elecció dels criteris diagnòstics en la definició del trastorn o la inclusió de dèficits funcionals com a requeriment per al diagnòstic (Rappley MD, 2005; Polanczyk *et al.*, 2007 i 2014; Skounti *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2015). El 2007, una metanàlisi de més de 100 estudis va estimar una prevalença del TDAH del 5,3% en infants i adolescents, i va concloure que no existien diferències significatives els diferents països (Polanczyk *et al.*, 2007). Més recentment, una altra metanàlisi basada en 33 estudis, va estimar la prevalença del TDAH en un 3,4% en infants i adolescents (Polanczyk *et al.*, 2015). Tot i la tendència a assumir que actualment existeix un sobre-diagnòstic d'aquest trastorn, múltiples estudis demostren que no hi ha evidències d'un augment dels símptomes o del diagnòstic de TDAH a través del temps (Polanczyk *et al.*, 2014; Collishaw S, 2015). Existeix un increment de la incidència clínica i el tractament que pot explicar-se per un major estat d'alerta de pares i professors vers la identificació del TDAH o de canvis en l'impacte dels símptomes en el funcionament dels infants (Sellers *et al.*, 2015). És més, diversos estudis han assenyalat que, de fet, existiria una situació de infra-diagnòstic del trastorn i ressalten la falta

d'evidències que recolzin un augment en la taxa de TDAH com a conseqüència de canvis socials (Tremmery *et al.*, 2007; Sayal *et al.*, 2010; McCarthy *et al.*, 2012).

Pel que fa a la prevalença del TDAH en l'adult, s'ha estimat que entre un 3-5% de la població adulta acompliria els criteris diagnòstics per TDAH (Kessler *et al.*, 2005; Kessler *et al.*, 2006; Fayyad *et al.*, 2007). El 2009, una metanàlisi basada en sis estudis va reportar una prevalença mitjana del 2,5% en adults, un valor força més conservador que podria estar reflectint la falta d'adequació dels criteris clínics del DSM-IV en el diagnòstic del TDAH en l'adult, fet que ha estat redreçat en el DSM-V (Simon *et al.*, 2009; American Psychiatric Association, 2000 i 2013). Addicionalment, també s'ha trobat que tot i el declivi de la simptomatologia del TDAH amb l'edat, existeix una persistència significativa dels símptomes en individus adults d'edat avançada, on diversos estudis epidemiològics han estimat una prevalença del TDAH que oscil·laria entre el 1,1 i el 3,3% en individus d'entre 65 a 94 anys (Guldborg-Kjær *et al.*, 2009; Michielsen *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2014; Torgersen *et al.*, 2016).

1.3.2. Distribució per categories diagnòstiques

També existeixen diferències en la prevalença del TDAH en funció del subtipus clínic considerat. Diversos estudis assenyalen que la presentació més habitual del trastorn seria el subtipus inatent, seguit del combinat i l'hiperactiu/impulsiu (Skounti *et al.*, 2007). Donat que els símptomes principals del TDAH no són estables, els subtipus clínics del trastorn també pateixen una evolució a mesura que es desenvolupa l'individu. Així, donat que els trets que defineixen la impulsivitat presenten una continuïtat intermitja, i els símptomes associats al domini de la hiperactivitat són els més làbils al llarg del temps, la freqüència del subtipus hiperactiu/impulsiu decreix proporcionalment amb l'edat, mentre que degut a la major persistència temporal que presenten els símptomes d'inatenció, la freqüència del subtipus inatent augmenta amb l'edat (Hudziak *et al.*, 1998; Biederman *et al.*, 2000).

1.3.3. Distribució per sexe i ètnia

En infants i adolescents, el TDAH afecta predominantment a nens en una proporció nen:nena de 4:1 en mostres clíniques i de 2,4:1 en mostres epidemiològiques (Polanczyk *et al.*, 2007). En la població adulta, les discrepàncies entre sexes pràcticament desapareixen i s'estima que la proporció home:dona oscil·la entre 1:1 i 3:1 (Matte *et al.*, 2015). Aquestes diferències entre la distribució del trastorn entre sexes a l'edat infantil i adulta han estat qüestionades, i s'han atribuït a la inexactitud de les estimacions com a

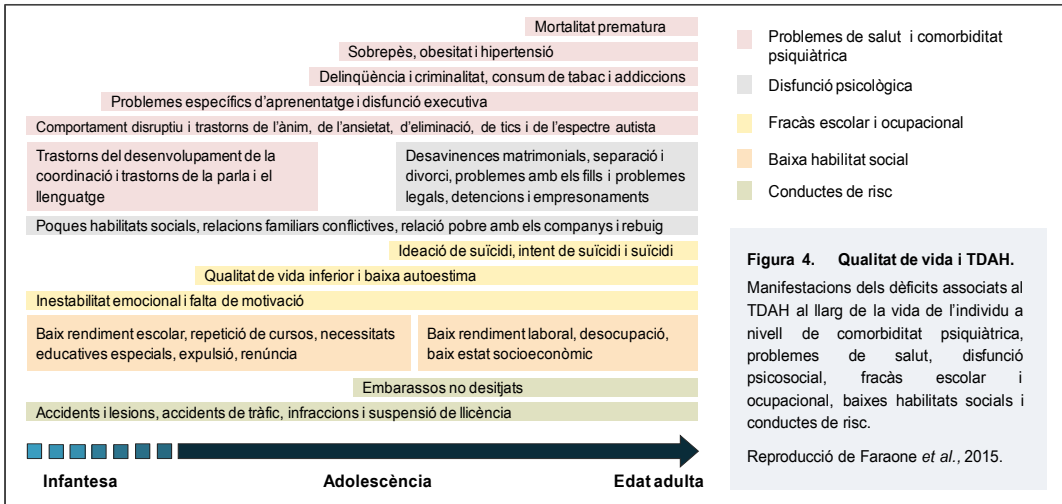
conseqüència de la possible inadequació dels criteris del DSM-IV per al diagnòstic del TDAH en el sexe femení, de les diferents manifestacions del trastorn entre sexes, i de biaixos en la cerca d'assistència clínica (Nussbaum NL, 2012; Williamson i Johnston, 2015).

Pel que fa a la influència de factors geogràfics o ètnics, existeix certa controvèrsia. Mentre que diversos estudis indiquen que la prevalença real del TDAH no variaria en funció d'aquests factors, altres estudis reporten associacions entre el TDAH i l'ètnia, tot i que en molts casos, factors com els patrons d'assistència clínica i les barreres per a l'atenció mèdica de cada grup ètnic, podrien explicar aquesta associació (Polanczyk *et al.*, 2007; Zwirs *et al.*, 2007; Lingineni *et al.*, 2012; Visser *et al.*, 2014).

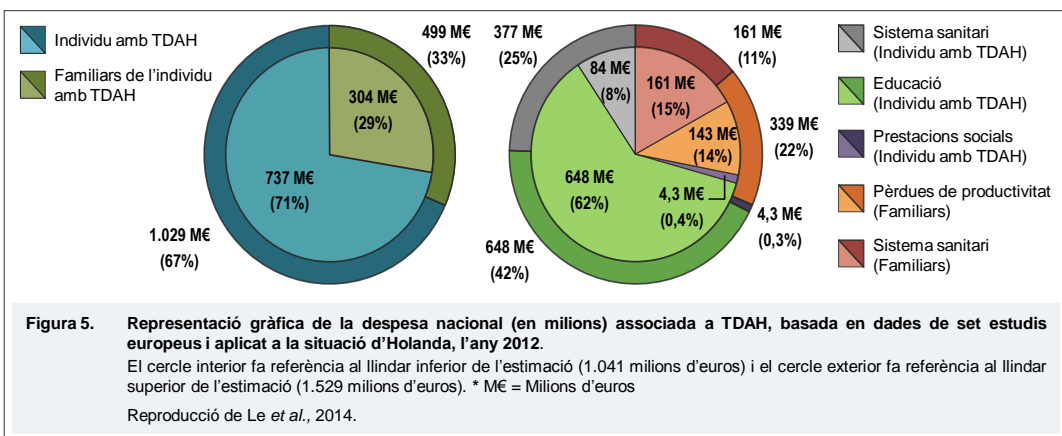
1.4. Impacte socioeconòmic

Nombrosos estudis posen de manifest l'important impacte funcional que comporta el TDAH a nivell **individual, social i econòmic** (Asherson *et al.*, 2012). S'ha demostrat que el TDAH condueix a un deteriorament del funcionament psicosocial de l'individu en un ampli ventall de contextos, que inclouen l'àmbit social, acadèmic i ocupacional, així com l'afectació de la percepció del benestar propi (Figura 4) (Danckaerts *et al.*, 2010).

El diagnòstic de TDAH s'associa durant la l'etapa infantil i l'adolescència a un major fracàs escolar, conflictes familiars, repercussions negatives a nivell social i rebuig per part dels companys, trastorns de conducta antisocial, baixa autoestima, conducta delictiva i consum de certes drogues, com el tabac (Biederman *et al.*, 2006; Frazier *et al.*, 2007; Loe i Feldman, 2007; Groenman *et al.*, 2013). En l'adolescència i en l'edat adulta, la presència de TDAH condueix a un menor èxit acadèmic i vocacional, dificultats d'adaptació al món laboral, desocupació, pitjor situació econòmica personal, inestabilitat emocional, obesitat i major incidència d'intents de suïcidi (James *et al.*, 2004; Biederman i Faraone, 2006; Langley *et al.*, 2010; Biederman *et al.*, 2012; Cortese *et al.*, 2013). Diversos estudis han reportat també que els individus amb TDAH o amb un diagnòstic de TDAH durant la infantesa tindrien un major risc de presentar comportaments antisocials severos, conductes delictives, empresonament i TUS, així com un increment significatiu de la mortalitat en comparació amb la població general, principalment com a resultat d'una major incidència d'accidents (Klein *et al.*, 2012; Lichtenstein *et al.*, 2012; Groenman *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2014; Dalsgaard *et al.*, 2015). En conseqüència, el benestar psicològic i social de l'individu amb TDAH es veuen reduïts, així com la seva qualitat de vida (Danckaerts *et al.*, 2010).



El TDAH també comporta una important càrrega econòmica a nivell del sector públic, derivada de les despeses en atenció sanitària i tractament, a la pèrdua d'ingressos deguda a l'atur laboral i a una major incidència d'accidents (Asherson *et al.*, 2012; Braun *et al.*, 2013; Telford *et al.*, 2013). El 2014, es van revisar set estudis de quatre països europeus (Bèlgica, Alemanya, Suècia i Regne Unit) i es va estimar que la despesa mitjana total associada a TDAH -aplicat a la població holandesa- comprenia dels 9.860 als 14.483 euros per individu, i que les despeses nacionals anuals anaven des de 1,04 a 1,53 milions d'euros, sent l'educació l'àrea de major inversió, seguit de la sanitat i les despeses socials (Figura 5) (Le *et al.*, 2014). A més, també s'ha de comptabilitzar la càrrega econòmica associada als familiars dels individus amb TDAH, que inclou dificultats financeres associades a tenir un infant amb el trastorn, problemes d'inserció laboral i pèrdues de productivitat (Ronis *et al.*, 2015).

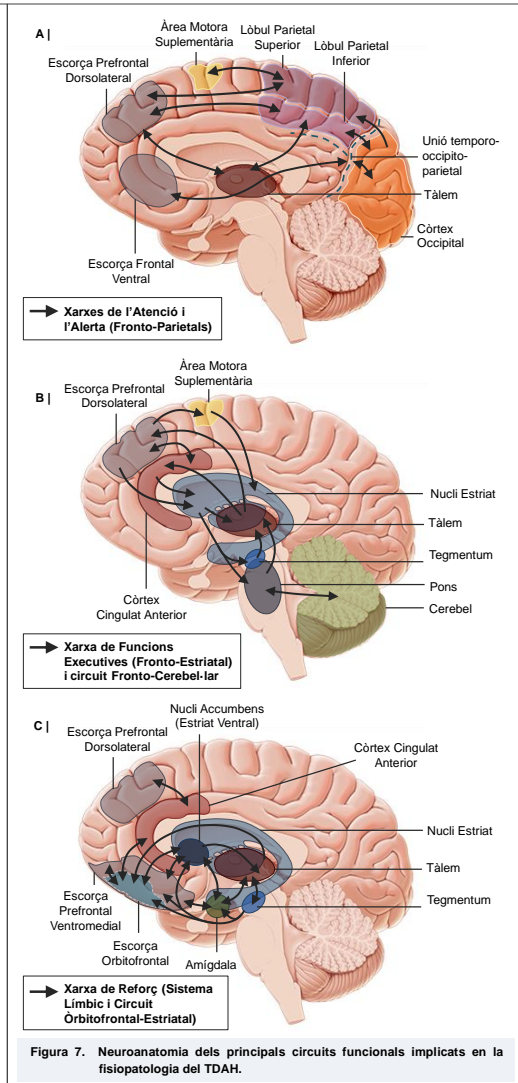
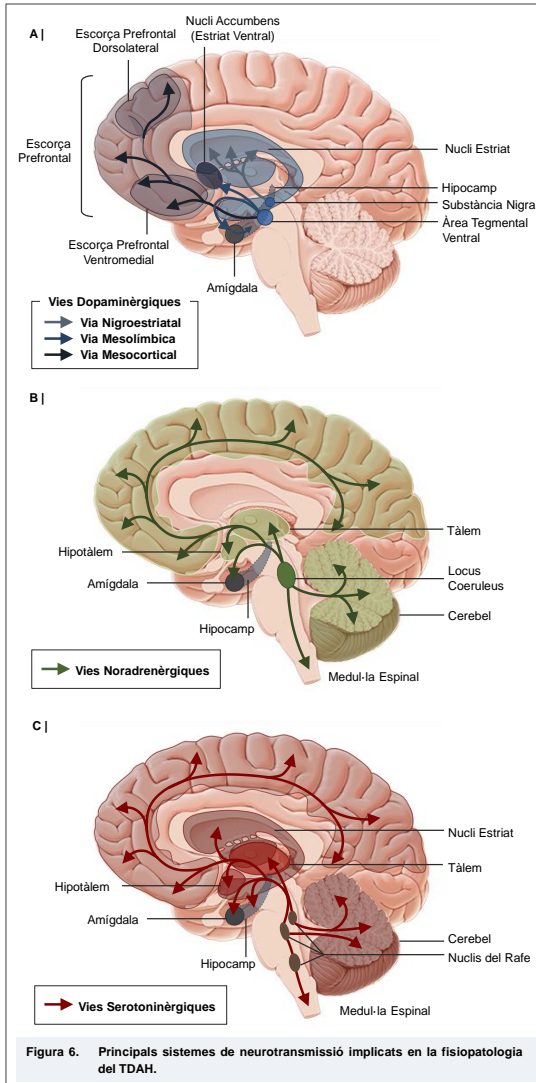


L'any 2010, el TDAH es va incloure en l'Estudi de la Càrrega Global de les Malalties (Global Burden of Disease Study Collaborators, 2010). La quantificació d'aquesta càrrega implica el càlcul dels anys viscuts amb incapacitat i els anys de vida perduts com a conseqüència d'una mort prematura. Ambdues mesures permeten el càlcul dels anys de vida ajustats per discapacitat (DALYs), la mesura final de la càrrega associada a una malaltia. Segons aquest estudi, el TDAH va ser responsable de 491 [280-775] mil DALYs l'any 2010, un 0,02% de la càrrega total atribuïda a malaltia, i de 479 [287-745] mil DALYs l'any 2013, el que correspon a un 0.019% (Global Burden of Disease Study Collaborators, 2010 i 2013).

1.5. Fisiopatologia

Inicialment, les hipòtesis sobre l'etiologia del TDAH s'havien centrat en l'existència de danys cerebrals deguts a malformacions cerebrals, complicacions en el moment del part -com ara hipòxia perinatal-, o a malalties infeccioses durant la infantesa (Lange *et al.*, 2010). Actualment, el TDAH es considera un trastorn **neurobiològic complex** i **multifactorial** en el que intervenen tant factors de risc **ambientals** com **genètics**, que afecten la integritat estructural i la capacitat funcional de les xarxes cerebrals, i condueixen a l'aparició dels símptomes, dèficits cognitius i alteracions funcionals que caracteritzen el trastorn (Faraone *et al.*, 2015; Thapar i Cooper, 2016). Tanmateix, encara no es coneixen amb exactitud els mecanismes biològics a través dels quals els factors genètics i ambientals actuen i interactuen per donar lloc a l'alteració del neurodesenvolupament en el TDAH, i roman per descobrir un marcador biològic que permeti realitzar un diagnòstic acurat del trastorn.

Resumidament, s'han identificat alteracions en els sistemes de neurotransmissió **dopaminèrgica**, **noradrenèrgica** i **serotoninèrgica**, gràcies a les evidències aportades a través dels estudis realitzats en models animals i en base a l'efectivitat del tractament farmacològic del TDAH en humans (Volkow *et al.*, 2002; Russell V, 2007; Levy F, 2009; Faraone i Buitelaar, 2010; Faraone i Glatt, 2010; Del Campo *et al.*, 2011; Solanto MV, 1998; Oades RD, 2008; Li *et al.*, 2014) (Figura 6 i Caixa 1). Els estudis de neurofisiologia i de neuroimatge cerebral realitzats fins al moment han recolzat aquestes troballes i han permès associar els dèficits cognitius del TDAH principalment a disfuncions a nivell **fronto-parieto-subcortical-cerebel·lar** i **fronto-límbic**, en regions i xarxes neurals implicades en les **funcions executives**, els **circuits del reforç** i la **motivació**, i les **xarxes atencionals** (Figura 7) (Makris *et al.*, 2009; Rubia *et al.*, 2010; Faraone *et al.*, 2015; Matthews *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2015).



1.5.1. Disfunció de dominis cognitius, xarxes neurals i sistemes de neurotransmissió

Disfunció de dominis cognitius. Tot i que no existeix un perfil cognitiu que defineixi el TDAH, s'han identificat diversos dèficits en múltiples dominis neuropsicològics. Durant les darreres dues dècades, les teories neurobiològiques del TDAH s'han centrat principalment en un model dual basat en l'alteració, per una banda, de les **funcions executives** i el **control cognitiu**, i per una altra, de les **funcions motivacionals** i de **reforç** (Figura 7). Les **funcions executives** inclouen processos cognitius que permeten l'organització complexa del comportament mitjançant la selecció i establiment dels processos o objectius apropiats, i el seu manteniment al llarg del temps. Els dèficits executius observats al TDAH

afecten a processos implicats en la conducta, la memòria de treball verbal i visuoespacial, el control inhibitori, la vigilància i la planificació de tasques. Per altra banda, les **funcions motivacionals i de reforç** inclouen processos implicats en els circuits de recompensa, en l'impuls en la realització d'accions i en el processament i la regulació emocional, on el sistema límbic juga un paper determinant (Matthews *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2015; Faraone *et al.*, 2015). Diversos estudis demostren que com a conseqüència de la desregulació dels mecanismes de reforç, els individus amb TDAH no realitzen decisions de forma òptima, presenten una motivació insuficient, prefereixen recompenses immediates a ajornades i sobreestimen la magnitud de les recompenses properes en comparació amb les llunyanes (Durstun *et al.*, 2011).

Altres dominis afectats en el TDAH inclouen el processament i organització de la informació temporal, la parla i el llenguatge, la capacitat de memòria, la variabilitat de la velocitat de processament i el temps de resposta, la vigília i activació, i el control motor (Toplak i Tannock, 2005; Tomblin i Mueller, 2012; Kuntsi i Klein, 2012; Fair *et al.*, 2012; Fliers *et al.*, 2009). En base a l'heterogeneïtat neuropsicològica del TDAH, alguns estudis recolzen un model neurobiològic triple en el que a més del domini executiu i de control cognitiu, i del domini motivacional i de reforç, també s'hi inclouria el **processament temporal** (Sonuga-Barke *et al.*, 2010).

Tot i que la majoria del individus amb TDAH mostren dèficits en un o dos dominis cognitius, existeix certa proporció d'individus que no mostren dèficits en cap d'aquests dominis i una fracció molt reduïda que presenta dèficits en tots ells (Coghill *et al.*, 2014).

Neuroanatomia i xarxes neurals. La neuroanatomia lligada als substrats neurals implicats en el TDAH inclouen regions corticals prefrontals específiques, que interaccionen amb regions corticals més posteriors i amb regions subcorticals i altres estructures. Les principals **regions corticals** implicades en el TDAH inclouen el còrtex prefrontal (CPF) dorsolateral, implicat en la memòria de treball; el CPF ventromedial i el còrtex òrbitofrontal, que participen en la presa de decisions complexes, la planificació estratègica i la regulació emocional i el reforç; l'àrea motora suplementària, implicada en el control del moviment; i el còrtex parietal, que dirigeix l'orientació de l'atenció. Les **estructures subcorticals** implicades en el TDAH inclouen el còrtex cingulat anterior (CCA) ventral i dorsal, l'amígdala, els ganglis basals i el tàlem, que aportarien els components emocional, motivacional i cognitiu del control executiu. Finalment, també hi estaria implicat el **cerebel**, que a més de coordinar les funcions motores, estaria participant en el processament temporal, l'atenció i la regulació cognitiva i emocional (Cortese S, 2012; Warikoo i Faraone, 2013; Faraone *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2015; Thapar i Cooper, 2016).

Aquestes regions i estructures s'organitzen i connecten formant diversos circuits neurals, la disfunció dels quals podria explicar els dèficits neuropsicològics del TDAH (Figura 7). Principalment, hi estaria implicat el circuit **fronto-estriatal**, que aporta els components cognitius i afectius al control executiu, la xarxa **fronto-parietal de l'atenció dorsal**, involucrada en l'orientació selectiva vers estímuls diana i respostes controlada per processos executius dirigits a objectius, i la xarxa **fronto-parietal de l'atenció ventral**, que intervé en la reorientació de l'atenció vers els estímuls externs nous, imprevistos o rellevants per a la conducta (Dickstein *et al.*, 2006; Cortese *et al.*, 2012; Faraone *et al.*, 2015). Per altra banda, també hi estaria implicat el sistema **fronto-límbic** i circuits com l'**òrbifrontal-estriatal** i el **fronto-amigdalari**, en els que se sustenta la resposta al reforç i la recompensa, la motivació i la regulació emocional. En base al model dual dels dominis cognitius del TDAH, s'ha suggerit que els trets d'**inatenció** i els **dèficits executius** resultarien de disfuncions en els circuits fronto-estriatals, mentre que la simptomatologia **hiperactiva/impulsiva** seria deguda a alteracions en la resposta al **reforç** i la **motivació**, implicant els circuits del sistema fronto-límbic (Sonuga-Barke EJ, 2003 i 2005; Durston *et al.*, 2011; Matthews *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2015). Addicionalment, també hi participaria la xarxa **fronto-cerebel·lar**, àmpliament vinculada a les àrees d'associació i àrees sensorimotors primàries, el tàlem i els circuits del reforç, i implicada en l'organització, el control motor, els càlculs d'interval de temps i les prediccions temporals, així com en funcions cognitives i emocionals -com ho demostren la disfunció d'aquest circuit durant la realització de paradigmes cognitius i les importants connexions existents entre el cerebel i altres regions cerebrals no-motors- (Fassbender i Schweitzer, 2006; Suskauer *et al.*, 2008; Strick *et al.*, 2009; Vloet *et al.*, 2010; Durston *et al.*, 2011; Hart *et al.*, 2012; Cortese *et al.*, 2012).

Sistemes de neurotransmissió. Les àrees i circuits cerebrals implicats en el TDAH són especialment riques en catecolamines, com la **dopamina** i la **noradrenalina** (Figura 6 i Caixa 1). El sistema dopaminèrgic està integrat per les vies mesolímbica, mesocortical i nigroestriatal, i juga un paper important en la planificació i iniciació de les respostes motores, el nivell d'activació, la reorientació de l'atenció, la reacció vers la novetat i el processament del reforç (Bokor i Anderson, 2014). La disfunció dopaminèrgica es creu que afectaria el control de les funcions executives implicant el CPF, CCA, els ganglis basals i el nucli estriat (Staller i Faraone, 2007; Warikoo i Faraone, 2013). La desregulació dels circuits noradrenèrgics conduiria a una funcionalitat ineficient del còrtex parietal superior, el tàlem i el cerebel. Aquest sistema està innervat pel locus coeruleus (LC) i està implicat en la modulació de l'arousal, en la raó senyal-versus-soroll en regions corticals i en la preparació cognitiva davant d'estímuls urgents (Biederman i Spencer, 1999; Warikoo i Faraone, 2013).

Caixa 1: Principals sistemes de neurotransmissió del sistema nerviós central (SNC) implicats en el TDAH**Sistema Dopaminèrgic**

La **dopamina** (DA) és un neurotransmissor monoaminèrgic i catecolaminèrgic. El sistema dopaminèrgic està principalment implicat en el control motor, la regulació de les emocions, la cognició, la conducta, la motivació i la recompensa.

Sistema Glutamatèrgic

El **glutamat** és el neurotransmissor excitatori més abundant del SNC. El sistema glutamatèrgic juga un paper important en la plasticitat sinàptica i en funcions cognitives com l'aprenentatge o la memòria.

Sistema Noradrenèrgic

La **noradrenalina** o **norepinefrina** (NE) és un neurotransmissor catecolaminèrgic que funciona també com a hormona. El sistema noradrenèrgic està implicat en l'alerta, l'excitació i la vigília, i modula el sistema de recompensa. Té un paper important en el sistema nerviós autònom simpàtic (sistema nerviós perifèric (SNP)).

Sistema Serotoninèrgic

La **serotonina** (5-HT) és un neurotransmissor monoaminèrgic. El sistema serotoninèrgic té una funció neuromoduladora general del SNC i està implicat en la funció motora, la conducta alimentària i sexual, l'humor, la son, la termoregulació, i les activitats respiratòries i cardiovasculars.

Sistema Colinèrgic

L'**acetilcolina** (ACh) és un neurotransmissor que actua tant al SNC com al SNP. Concretament, l'ACh actua al SNP activant els músculs i constitueix el neurotransmissor més abundant del sistema nerviós autònom. Al SNC, té un paper anti-excitatori i actua com a neuromodulador de la plasticitat sinàptica, l'aprenentatge i la memòria a curt termini, l'excitació i la vigília, i la recompensa.

Múltiples estudis també han reportat alteracions en les vies **serotoninèrgiques** i proposen un rol causal d'aquest sistema en la fisiopatologia del TDAH (Figura 6 i Caixa 1) (Solanto MV, 1998; Oades RD, 2008; Li *et al.*, 2014a). Les vies serotoninèrgiques s'originen als nuclis del rafe i es projecten pràcticament a tot el SNC, incloent el còrtex cerebral i estructures subcorticals, on regulen funcions cognitives i afectives. Aquest sistema exerceix una funció neuromoduladora general i, en especial, sobre la neurotransmissió dopaminèrgica i les xarxes neurals noradrenèrgiques implicades en l'alerta i la vigilància (Oades RD, 2008). L'alteració de la neurotransmissió serotoninèrgica s'ha associat a conducta impulsiva, comportament agressiu, menor temps de reacció, i desinhibició en infants i adolescents amb TDAH (Halperin *et al.*, 1997; Gainetdinov *et al.*, 1999; Zepf *et al.*, 2008a, 2008b i 2008c).

Adicionalment, altres investigacions han recolzat també la participació dels sistemes de neurotransmissió **glutamatèrgica** i **colinèrgica** en el TDAH, que exercirien un important paper regulador en l'alliberació de dopamina a nivell fronto-estriatal. (Sarter i Paolone, 2011; Dransdahl *et al.*, 2011; Hammerness *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014a; Wu *et al.*, 2000; Kosillo *et al.*, 2016).

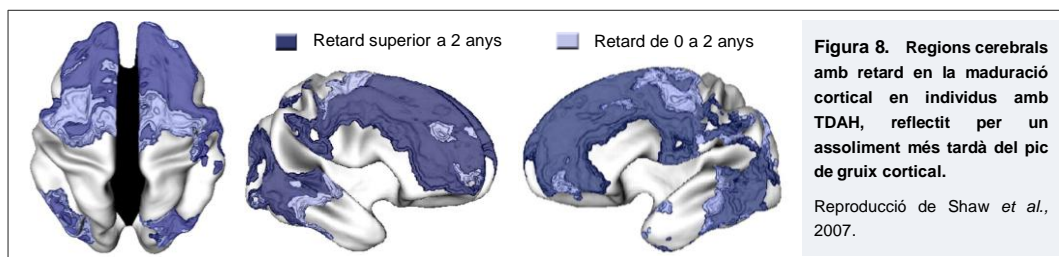
Finalment, s'ha suggerit que la disfuncionalitat cognitiva del TDAH es podria deure a un estat hipodopaminèrgic al CPF, mentre que la hiperactivitat seria deguda a un estat hiperdopaminèrgic al nucli estriat (Solanto MV, 2002). Per altra banda, altres estudis proposen que les alteracions fisiopatològiques del trastorn podrien resultar d'un desequilibri en l'activitat relativa dels neurotransmissors, amb una elevada activitat dopaminèrgica en relació a la noradrenèrgica, i una baixa activitat dopaminèrgica en relació a la serotoninèrgica (Oades RD, 2002).

1.5.2. Neuroimatge

Mitjançant tècniques de neuroimatge estructural i funcional s'han pogut identificar les diferents regions cerebrals i vies neurals implicades en el TDAH que s'han descrit a l'apartat anterior, i se n'ha pogut avaluar la seva disfuncionalitat en subjectes amb el trastorn.

Neuroimatge estructural. Aquesta tècnica permet obtenir imatges tomogràfiques en qualsevol direcció de l'espai, així com informació sobre la composició d'un cos, mitjançant radiació no ionitzant (camps de radiofreqüència). Mitjançant ressonància magnètica (RM) estructural, s'ha detectat que la mida cerebral total dels individus amb TDAH seria entre un 3 i un 5% inferior en comparació amb subjectes sans, tret que s'ha trobat negativament correlacionat amb els símptomes del trastorn en la població general (Castellanos *et al.*, 2002; Durston *et al.*, 2004, Valera *et al.*, 2007; Hoogman *et al.*, 2012). Diversos estudis reporten un aprimament cortical en individus amb TDAH, principalment en regions frontals, tot i que també en regions parietals, temporals i occipitals (Shaw *et al.*, 2006 i 2011; McAlonan *et al.*, 2007; Depue *et al.*, 2010; Batty *et al.*, 2010; Mathews *et al.*, 2014; Kasperek *et al.*, 2015). Pel que fa a estructures subcorticals i altres regions, estudis de metanàlisi han reportat de forma consistent un volum inferior dels nuclis caudat, globus pallidus dret i putamen dret, del cerebel (total i del vermis cerebel·lar), i del CCA. Altres estudis també han identificat una reducció de la mida de l'amígdala, el nucli accumbens i el tàlem, entre altres regions amb resultats més inconsistents (Valera *et al.*, 2007; Ellison-Wright *et al.*, 2008; Depue *et al.*, 2010; Nakao *et al.*, 2011; Frodl i Skokauskas, 2012, Kasperek *et al.*, 2015; Durston *et al.*, 2011).

Per altra banda, diversos estudis d'imatge longitudinals suggereixen que algunes de les anomalies estructurals observades en infants amb TDAH a les regions frontals, parietals, estriats i cerebel·lars es deuen a un retard en la **maduració** (Figura 8) (Castellanos *et al.*, 2002; Shaw *et al.*, 2007 i 2011). Aquests resultats es veuen reforçats per l'endarreriment en el desenvolupament de la superfície cerebral identificat en subjectes amb TDAH i la correlació observada entre la reducció del gruix cortical -que reflexa la maduració cognitiva i funcional del cervell-, i els símptomes d'hiperactivitat i impulsivitat (Wolosin *et al.*, 2009; Shaw *et al.*, 2011 i 2012a). Diversos estudis mostren que algunes d'aquestes alteracions cerebrals volumètriques es fixen, com ara la reducció de l'estriat dorsal en infants amb TDAH, mentre que d'altres semblen evolucionar amb l'edat, com ara la tendència a la normalització de la reducció dels nuclis caudat dret i putàmen, o la contracció progressiva que pateix l'estriat ventral (Nakao *et al.*, 2011; Frodl i Skokauskas, 2012; Greven *et al.*, 2015; Shaw *et al.*, 2014).

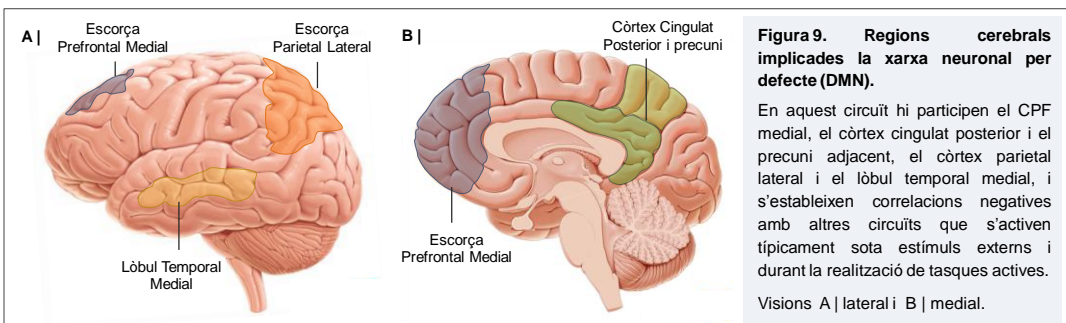


A més, diversos estudis d'imatge mitjançant **tensor de difusió**, una tècnica basada en RM que permet veure el sentit de les fibres axonals de substància blanca i generar un mapa de connexions o **connectoma**, han reportat extenses alteracions de la integritat i la connectivitat estructural dels tractes, sobretot de la corona radiata anterior (circuitus fronto-estriatals) i el fascicle longitudinal superior (circuitus fronto-parietals), però també del forceps menor, la càpsula interna i el cerebel (Overmeyer *et al.*, 2001; Castellanos *et al.*, 2002; Ashtari *et al.*, 2005; Konrad i Eickhoff, 2010; Durston *et al.*, 2011; van Ewijk *et al.*, 2012). Algunes d'aquestes alteracions s'han trobat correlacionades amb el nivell d'activació de regions cerebrals concretes durant la realització de tasques cognitives, així com amb els resultats d'aquestes tasques (Casey *et al.*, 2007).

Neuroimatge funcional. Es basa en l'estudi no invasiu del flux sanguini regional del cervell i el seu metabolisme per a mesurar el nivell d'activitat neural de les regions involucrades en la realització d'una tasca concreta en estat d'actuació (*performance*), d'activació (*challenge*), o durant el repòs. En l'àmbit del TDAH, els estudis de RM funcional han detectat una activitat inferior de les estructures que conformen les xarxes **fronto-estriatal**, **òrbitofrontal-estriatals** i **fronto-parietals** de l'**atenció dorsal** i **ventral**, l'**alerta** i l'**activació**, durant la realització de tasques de control inhibitori, memòria de treball o tasques d'atenció vigilant, selectiva o flexible (Figura 7) (Dickstein *et al.*, 2006; Cortese *et al.*, 2012; Faraone *et al.*, 2015). Concretament, s'ha identificat una menor activació funcional del CPF dorsolateral i ventrolateral, còrtex òrbitofrontal, còrtex temporo-parietal, CCA, àrea suplementària motora, tàlem i ganglis basals (Dickstein *et al.*, 2006; Rubia K, 2011; Hart *et al.*, 2012; Cubillo *et al.*, 2012; Hart *et al.*, 2013). Durant la realització de tasques temporals, s'ha observat una menor activació d'estructures de la xarxa **fronto-cerebel·lar**, incloent el CPF ventrolateral, CPF dorsolateral i el vermis cerebel·lar, així com l'àrea suplementària motora i el CCA (Durston *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2008; Rubia *et al.*, 2009; Vloet *et al.*, 2010). Addicionalment, també s'han detectat canvis en l'activitat cerebel·lar sota paradigmes cognitius i una hiperactivació dels **sistemes somatomotor** i **visual** (Strick *et al.*, 2009; Durston *et al.*, 2011; Fassbender i Schweitzer, 2006; Cortese *et al.*, 2012). Pel que fa a paradigmes de processament

del reforç, la troballa més consistent ha estat la hipoactivació de l'**estriat ventral**, tot i que també s'han detectat anomalies en l'activació del CPF ventromedial, el còrtex òrbitofrontal, el tàlem, l'amígdala i la substància negra (Furukawa *et al.*, 2014; von Rhein *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2016; Scheres *et al.*, 2007; Plichta i Scheres, 2014; Bitsakou *et al.*, 2009; Marco *et al.*, 2009; Rubia K, 2011). Per últim, tot i que la inestabilitat emocional és freqüent en el TDAH, molt pocs estudis de RM funcional han avaluat els déficits neurals implicats en el processament de les **emocions** (Makris *et al.*, 2009; Stringaris A, 2011; Cubillo *et al.*, 2012; van Stralen J, 2016). En aquests estudis, tot i que no s'han identificat alteracions en el processament de les expressions facials de temor, sí que s'ha reportat una menor activació de la ínsula, els ganglis basals i el tàlem en subjectes amb TDAH durant la visualització d'imatges negatives (Marsh *et al.*, 2008; Brotman *et al.*, 2010; Herpertz *et al.*, 2008).

Per altra banda, els estudis que han avaluat la connectivitat funcional mitjançant RM funcional, demostren que les alteracions observades en subjectes amb TDAH no es restringeixen al nivell d'activació de regions cerebrals concretes. En aquest sentit, s'han detectat alteracions de la connectivitat funcional principalment en els circuits fronto-parietals, en tasques d'interferència del control cognitiu, i fronto-cerebel·lars, en paradigmes de discriminació temporal (Vloet *et al.*, 2010). No obstant, algunes de les troballes més rellevants s'han identificat mitjançant estudis de RM funcional **en repòs**, que han permès detectar alteracions en la connectivitat funcional de la **xarxa neuronal per defecte (DMN)** (Figura 9). En aquest circuit hi participen el CPF medial, el còrtex cingulat posterior i el precuni adjacent, el còrtex parietal lateral i el lòbul temporal medial, i s'estableixen correlacions negatives amb altres circuits que s'activen típicament sota estímuls externs i durant la realització de tasques actives. És a dir, la DMN incrementa la seva activitat en absència de conductes dirigides a objectius externs, durant l'estat de repòs de l'individu o quan aquest té pensaments interns. En l'àmbit del TDAH, s'ha detectat una menor activitat o inclús, l'absència, de les correlacions negatives existents entre la DMN i les xarxes implicades en el control cognitiu, així com a una menor connectivitat dins de la mateixa DMN (Uddin *et al.*, 2008; Fair *et al.*, 2010; Mills *et al.*, 2012; Posner *et al.*, 2014).



1.6. Tractament

L'abordatge terapèutic del TDAH inclou tant **estratègies no farmacològiques**, com **tractaments farmacològics**, i té com a objectiu millorar l'adaptació funcional de l'individu al seu context, proporcionar-li eines per a afrontar els reptes del seu desenvolupament i conduir a una millora estable de la seva qualitat de vida (Fiks *et al.*, 2013).

1.6.1. Tractament no-farmacològic

Existeix un ampli ventall d'estratègies no-farmacològiques en l'abordatge del TDAH que incideixen, principalment, sobre la dieta, la conducta i la cognició. En general, els estudis semblen indicar que tot i la demostrada eficàcia d'aquests tractaments, la mida de l'efecte seria menor al dels tractaments farmacològics optimitzats (Ghuman i Ghuman, 2013; Faraone *et al.*, 2015; Sonuga-Barke *et al.*, 2013; Faraone i Antshel, 2014).

Intervencions conductuals. Constitueixen la forma de tractament no-farmacològic més ben establerta, utilitzada i recomanada (Piffner i Haack, 2014). Es basen en augmentar el valor del reforç positiu/negatiu i en l'aprenentatge social, per tal de reduir els comportaments inadequats, afavorir les conductes apropiades i millorar les relacions familiars (Wells *et al.*, 2000; Piffner i Haack, 2014). Segons una metanàlisi, tot i el seu efecte limitat sobre la reducció dels símptomes de TDAH, produeixen una millora considerable de les relacions familiars i dels trastorns conductuals. El seu ús es recomana com a complement de la teràpia farmacològica on, tot i no aportar beneficis addicionals als de la medicació pel que fa a la simptomatologia, sí que s'han reportat millores en els dèficits funcionals o en la necessitat d'una dosi menor de fàrmac (Daley *et al.*, 2014; MTA Cooperative Group, 1999; Mongia i Hechtman, 2012). Durant l'etapa infantil, l'abordatge conductual s'aplica en forma d'educació i entrenament parental, mentre que en l'adolescent i l'adult, addicionalment, es recomanen els abordatges cognitivo-conductuals i l'entrenament o *coaching* d'habilitats dirigits a facilitar la gestió de la vida de l'individu (Safren SA, 2006; Knouse i Safren, 2010; Antshel i Olszewski, 2014; Faraone i Antshel, 2014).

Intervencions neurocognitives. Certs assajos destaquen el valor de les intervencions neurocognitives, sobretot pel que fa al tractament de la inatenció (Lofthouse *et al.*, 2012; Holtmann *et al.*, 2014). Una de les estratègies més emprades és el *neurofeedback* o retroalimentació electroencefalogràfica, que empra tècniques adaptatives basades en el reforç per tal de normalitzar els dominis electrofisiològics que es

troben alterats en els individus amb TDAH (Arns *et al.*, 2009; Lofthouse *et al.*, 2012; Faraone i Antshel, 2014). Existeixen també altres estratègies que tenen com a objectiu la millora de funcions com la memòria de treball o la inhibició a través de l'entrenament continu, tot i que no existeixen evidències fermes que recolzin els seus beneficis en els símptomes del TDAH o en altres dèficits funcionals (Klingberg *et al.*, 2005; Sonuga-Barke *et al.*, 2014; Cortese *et al.*, 2015).

Intervencions dietètiques. Aquestes estratègies inclouen tant la incorporació de suplementes a la dieta -com els àcids grassos lliures-, com les exclusions -com ara els additius alimentaris artificials- (Sonuga-Barke *et al.*, 2013; Nigg i Holton, 2014; Stevenson *et al.*, 2014; Hawkey i Nigg, 2014). Un estudi de metanàlisi relativament recent va concloure que els abordatges dietètics poden exercir un efecte terapèutic positiu, però limitat, en el tractament del TDAH (Stevenson *et al.*, 2014).

1.6.2. Tractament farmacològic

La selecció del tractament farmacològic es basa en l'avaluació de la severitat dels símptomes de TDAH de l'individu, de la presència de comorbiditat, i del període del dia en què és necessari eliminar la simptomatologia. Existeixen dos grans grups de fàrmacs en el tractament del TDAH: els fàrmacs **psicoestimulants** i els **no-psicoestimulants**. Les metanàlisis realitzades han demostrat que ambdues teràpies redueixen la simptomatologia, tant en infants com en adults, i que milloren l'evolució del trastorn, tot i que no arriben a una situació completament normalitzada (Faraone i Glatt, 2010; Faraone i Buitelaar, 2010). El tractament farmacològic és, generalment, a llarg termini, a excepció dels casos de TDAH en què el trastorn no presenta un curs persistent. Múltiples evidències indiquen que el tractament a llarg termini comporta una millora de la simptomatologia del TDAH, i una millora limitada i inconscient del funcionament social, l'èxit acadèmic, l'estat laboral i la comorbiditat psiquiàtrica (van de Loo-Neus *et al.*, 2011; Shaw *et al.*, 2012b; Langberg i Becker, 2012; Fredriksen *et al.*, 2013).

Fàrmacs psicoestimulants. A finals dels anys trenta, Charles Bradley va reportar per primera vegada els efectes positius de l'administració de fàrmacs psicoestimulants a infants amb diferents trastorns de la conducta, entre els quals hi havia una sèrie de casos amb alteracions emocionals, i problemes severs d'aprenentatge i el comportament, que probablement serien diagnosticats de TDAH a l'actualitat (Bradley C, 1937; Gross MD, 1995). Actualment, s'ha confirmat la seva eficàcia, que seria, en general, superior a la dels fàrmacs no-psicoestimulants, i constitueixen el tractament farmacològic d'elecció en

pacients amb TDAH de totes les edats (Wilens i Spencer, 2000; Banaschewski *et al.*, 2006; Nutt *et al.*, 2007; Faraone *et al.*, 2006b; Atkinson i Holli, 2010). Aproximadament, el 70% dels infants tractats amb psicoestimulants demostren una millora de la simptomatologia primària, així com de la comorbiditat associada (American Academy of Pediatrics, 2001; Nutt *et al.*, 2007). En el cas dels adults, els estudis indiquen que entre un 10-50% es considerarien no-responedors, degut a una reducció insuficient de la simptomatologia o a la incapacitat de tolerar els efectes adversos (Wilens *et al.*, 2002; Mohammadi i Akhondzadeh, 2007). En general, les dades reportades indiquen que el 70% dels individus amb TDAH responen positivament al primer fàrmac psicoestimulant administrat, i s'han reportat percentatges de més del 90% quan s'inclouen els individus no-responedors per al primer tractament, que responen positivament al segon fàrmac psicoestimulant administrat (Wigal SB, 2009).

El grup dels psicoestimulants està integrat per un conjunt heterogeni de compostos amb diferències tant a nivell farmacodinàmic com farmacocinètic, i que presenten diferents mecanismes d'acció i formes farmacèutiques tant d'acció curta com d'acció perllongada (Rostain *et al.*, 2015). Inclouen el metilfenidat, les amfetamines, la pemolina, el modafinil o el bupropion. El **metilfenidat** constitueix el tractament psicoestimulant més efectiu i d'elecció per a tractar el TDAH, i és l'únic a Espanya que disposa d'indicació per al tractament del trastorn (Atkinson i Holli, 2010). Actua principalment com a inhibidor de la recaptació de dopamina i, en menor mesura, de la noradrenalina, però també mostra activitat sobre el receptor de dopamina DRD1 i els sistemes de neurotransmissió serotoninèrgic, histaminèrgic i colinèrgic (Wilens TE, 2008). Les **amfetamines** també inhibeixen la recaptació de la dopamina i la noradrenalina, així com promouen l'alliberació de la dopamina a l'espai sinàptic i inhibeixen la seva degradació a nivell presinàptic (Fleckenstein *et al.*, 2007). La **pemolina** inhibeix la recaptació de la dopamina i incrementa la seva alliberació a l'espai sinàptic, però el seu ús és molt limitat degut a la seva toxicitat hepàtica i, concretament a Espanya, no es troba disponible (Stevenson i Wolraich, 1989; Wilens *et al.*, 1999). El **modafinil** es creu que podria actuar com a inhibidor selectiu atípic del recaptador de dopamina amb un efecte molt lleu, o bé augmentant el nivell de catecolamines actuant de forma indirecta sobre els sistemes glutamatèrgic, gabaèrgic, histaminèrgic i orexigènic (Minzenberg i Carter, 2008; Zolkowska *et al.*, 2009; Ishizuka *et al.*, 2012). Tot i que ha demostrat ser efectiu en relació a la simptomatologia del TDAH, a Espanya està indicat només en el tractament de la narcolèpsia (Weber *et al.*, 2008; Kahbazi *et al.*, 2009; Kaplan i Newcorn, 2011). Per últim, el **bupropió** o amfebutamona, actua com a inhibidor de la recaptació de la dopamina i la noradrenalina amb un efecte més dèbil que el del metilfenidat, i com a bloquejant dels receptors nicotínics (Learned-Coughlin *et al.*, 2003; Jefferson *et al.*, 2005; Dvoskin *et al.*, 2006).

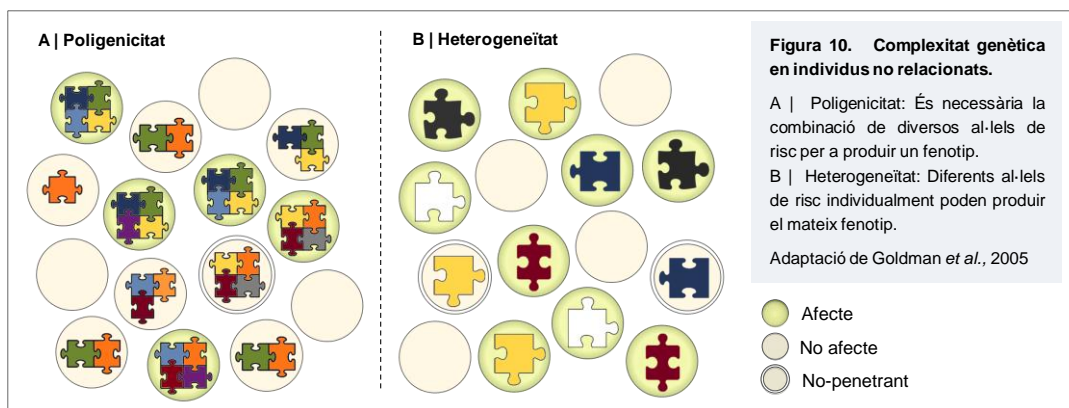
Pel que fa als efectes adversos dels fàrmacs psicoestimulants, els més comuns són l'insomni, la disminució de la gana, la disfòria i la irritabilitat, tot i que també s'han descrit efectes severos molt poc freqüents, com tics, ansietat, trastorn depressiu major, psicosi o mania, el que requereix la immediata discontinuació del tractament (Wigal SB, 2009; Childress i Sallee, 2014; Wilens TE, 2007). Altres estudis han associat el tractament amb psicoestimulants a un lleu retard en el creixement o a alteracions cardiovasculars greus (Faraone *et al.*, 2008; American Academy of Pediatrics/American Heart Association, 2008; Dalsgaard *et al.*, 2014).

Fàrmacs no-psicoestimulants. Donada la vulnerabilitat de molts pacients a desenvolupar comorbiditat amb un trastorn per abús de drogues psicoestimulants, la investigació farmacològica també s'ha centrat en la cerca i desenvolupament de psicofàrmacs sense potencial d'abús (Safren SA, 2007; Kaplan i Newcorn, 2011). Entre els compostos amb més evidències sobre la seva eficàcia i seguretat en el tractament d'infants i adults amb TDAH es troba l'**atomoxetina**, un inhibidor selectiu de la recaptació de la noradrenalina (Spencer *et al.*, 2004; Verbeeck *et al.*, 2009; Ramos-Quiroga *et al.*, 2006; Wigal SB, 2009; Bushe i Savill, 2014; Asherson *et al.*, 2014). Constitueix l'únic dels fàrmacs no-psicoestimulants que compta amb la indicació per al tractament del trastorn (Ramos-Quiroga *et al.*, 2006; Wigal SB, 2009). Els **antidepressius tricíclics** actuen com a inhibidors de la recaptació de la serotonina i la noradrenalina, i els **agonistes adrenèrgics α_2** , com la clonidina i la guanfacina, actuen com a inhibidors selectius del recaptador de noradrenalina. Aquests últims, tenen un ús força limitat degut al potent efecte sedatiu que provoquen en alguns pacients (Biederman *et al.*, 2008; Verbeeck *et al.*, 2009; Wigal SB, 2009; Jain *et al.*, 2011; Faraone *et al.*, 2013). Per últim, tot i que s'han realitzat assajos que indiquen que la modulació dels **receptors nicotínics** podria ser una potencial estratègia en el tractament del TDAH, els usos terapèutics de la nicotina són encara molt limitats degut als seus efectes secundaris (Shytle *et al.*, 2002).

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

2. Etiologia del TDAH

El TDAH és un trastorn d'etiologia **complexa** i **multifactorial** i, per tant, el que en determina la seva aparició és la suma de l'efecte de múltiples **factors genètics** i **ambientals**. És a dir, l'acció combinada de diverses variants configura la base genètica de susceptibilitat a desenvolupar el trastorn, que és característicament **poligènica** i **heterogènia** (Figura 10). Aquesta, sota la influència d'un ambient determinat, s'expressarà d'una forma diferencial i conduirà a l'aparició del fenotip (Li et al., 2014a; Faraone et al., 2015; Hawi et al., 2015).

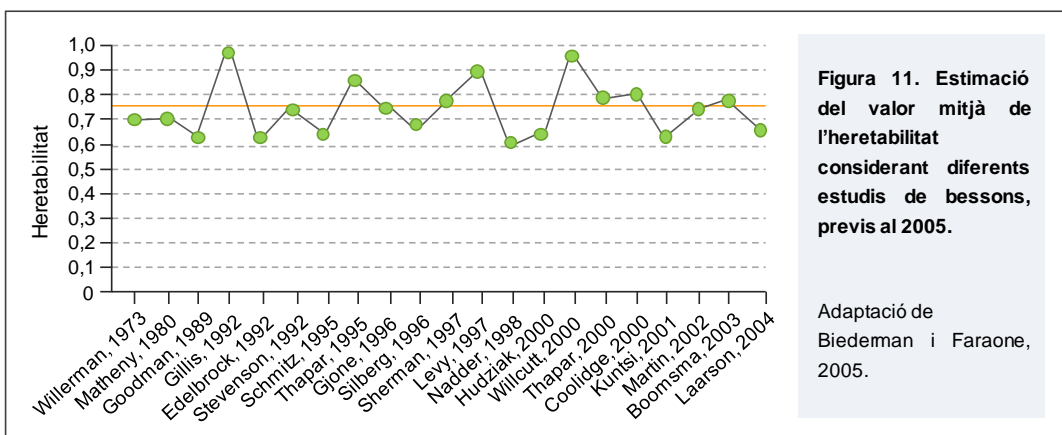


Per tal de determinar la contribució relativa dels factors genètics i ambientals en l'etiologia del TDAH, s'han dut a terme nombrosos **estudis familiars, de bessons i d'adopció** que han aportat importants evidències que recolzen el marcat component genètic del TDAH. El trastorn està influenciat tant per factors genètics estables com per factors que influeixen en diferents etapes del desenvolupament, des de la infantesa a l'edat adulta. Per tant, la variació genètica contribueix a l'aparició, la persistència i la remissió del trastorn, i ho fa probablement a través del desenvolupament de dèficits neurobiològics estables i de processos de maduració o compensació que influeixen en el desenvolupament de l'individu (Franke et al., 2012; Li et al., 2014a; Faraone et al., 2015; Hawi et al., 2015).

Estudis familiars. Es basen en la comparació de la freqüència o semblança (correlació) d'un tret entre subjectes, en funció del grau de relació biològica existent entre ells. Aquests estudis indiquen que els familiars d'individus amb TDAH presenten un risc major de desenvolupar el trastorn que els familiars d'individus no afectes. S'ha estimat que els familiars de primer grau d'un individu amb TDAH presenten

un risc entre quatre i cinc vegades superior a desenvolupar el trastorn en comparació amb familiars de segon o tercer grau; i entre cinc i deu vegades superior en comparació amb la població general (Biederman *et al.*, 1990 i 1992; Cantwell DP, 1972). També s'ha mostrat que els germans d'individus adults amb TDAH mostren un major risc de patir el trastorn en comparació amb germans d'infants amb TDAH (Manshadi *et al.*, 1983). En línia amb aquests resultats, en un estudi prospectiu es va observar una major prevalença del trastorn en pares i germans d'infants en els que el TDAH persistia fins l'edat adulta, en comparació amb els familiars d'individus en els que el trastorn havia remès (Biederman *et al.*, 1996). Aquestes dades indicarien que els individus amb TDAH persistent presentarien una major càrrega genètica que aquells en què el trastorn remet (Biederman *et al.*, 1998; Faraone *et al.*, 2000).

Estudis de bessons. Es basen en la comparació de parelles de bessons monozigòtics i dizigòtics discordants per a un determinat tret. Mitjançant aquests estudis s'ha pogut estimar l'**heretabilitat** del trastorn, que es defineix com la proporció de la variança fenotípica explicada per la variabilitat dels factors genètics en una població. Tanmateix, aquesta definició només és aplicable a trets quantitius, i quan es fa referència a trets fenotípics binaris -com en el cas del diagnòstic categòric del TDAH-, el terme heretabilitat es pot derivar mitjançant el concepte de **labilitat**, que s'entén com a una mesura quantitativa de la **probabilitat** d'un individu a desenvolupar un trastorn concret. És a dir, es considera que un individu presenta la malaltia si la seva labilitat excedeix un determinat llindar. Així doncs, en el cas de trets binaris es parla de l'**heretabilitat de la labilitat** (Dempster i Lerner, 1950). En l'àmbit del TDAH, els estudis de bessons han estimat que la seva heretabilitat estaria situada al voltant del 70-80%, tant en infants com en adults (Figura 11) (Larsson *et al.*, 2014a; Franke *et al.*, 2012; Asherson i Gurling, 2012; Faraone *et al.*, 2005; Biederman i Faraone, 2005).



Per altra banda, els resultats d'altres estudis indiquen que tot i que el diagnòstic del TDAH és una entitat categòrica, el trastorn es podria concebre com l'extrem més incapacitant de la distribució d'un o més trets quantitius amb diferents heretabilitats, anomenats també fenotips intermitjos o **endofenotips** (Larsson *et al.*, 2012). En línia amb aquestes dades, s'ha observat que en bessons dizigòtics discordants pel TDAH, els germans sans presenten un pitjor rendiment en funcions executives en comparació amb subjectes controls sans (Bidwell *et al.*, 2007). S'ha descrit que el domini d'hiperactivitat/impulsivitat presentaria una heretabilitat més elevada que el domini de la inatenció, i que la correlació entre ambdós seria del 0,6, el que reflecteix un important solapament genètic, alhora que una part específica pròpia de cada domini (McLoughlin *et al.*, 2007; Larsson *et al.*, 2013).

Estudis d'adopció. Es basen en la comparació de les semblances entre els fills adoptats, els seus pares biològics i els pares adoptius, assumint que els ambients de les famílies biològica i adoptiva són independents entre ells. Mitjançant aquests estudis s'ha observat que la freqüència de TDAH és superior entre familiars biològics dels individus amb el trastorn, que entre familiars adoptius, el que posa en rellevància la importància dels factors genètics en l'etiologia del TDAH.

2.1. Factors Genètics

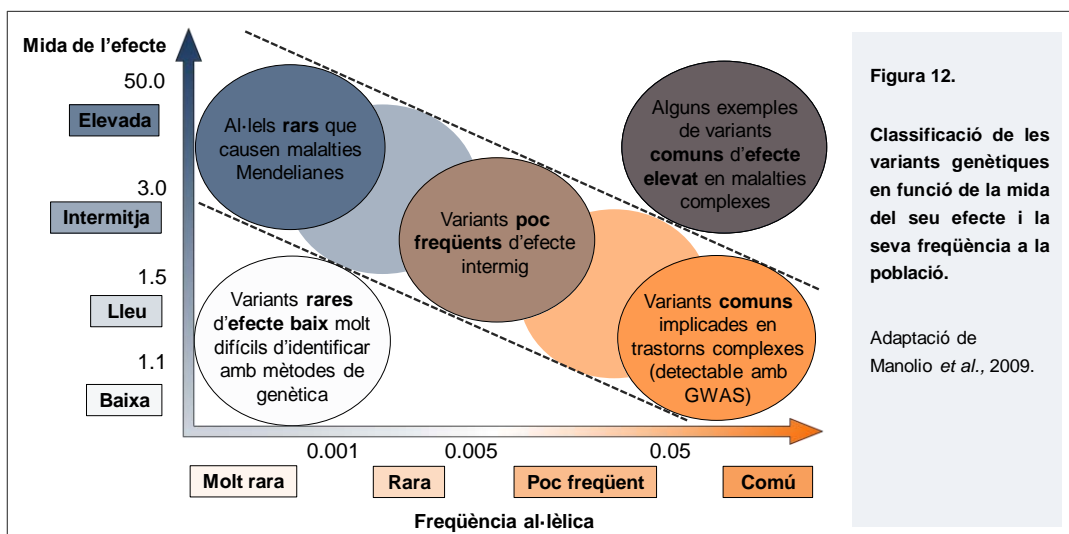
2.1.1. Variants genètiques de risc en el TDAH

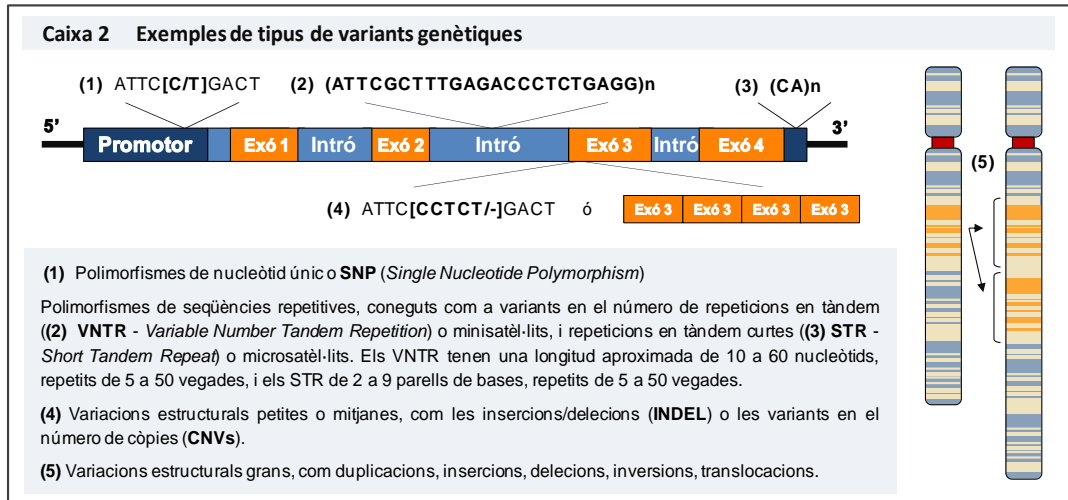
La implicació dels factors genètics en l'etiologia del TDAH, demostrada a través dels estudis descrits en l'apartat anterior, ha fet necessària la investigació més exhaustiva de la base genètica del trastorn i la seva caracterització a través de diferents metodologies. S'han emprat diferents abordatges en funció de la **freqüència** de les variants genètiques estudiades en la població general, i de la seva **penetrància**, que es defineix com la proporció d'individus que sent portadors d'un al·lel determinat expressa el fenotip associat, i que dóna idea de la mida de l'efecte d'aquestes variants (Figura 12) (Manolio *et al.*, 2009).

Pel que fa a l'arquitectura genètica del TDAH, s'han identificat diferents classes de variants genètiques associades al risc de desenvolupar el trastorn (Sharp *et al.*, 2009; Banaschewski *et al.*, 2010; Faraone i Mick, 2010; Franke *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014a; Thapar i Cooper, 2016) (Caixa 2). Per una banda, existeixen variants rares que es presenten amb una freqüència al·lèlica molt baixa a la població general, però que mostren una elevada penetrància. Aquestes variants habitualment donen lloc a malalties monogèniques d'herència Mendeliana, i no semblen desenvolupar un paper massa important

en complexitat genètica del TDAH. Per altra banda, existeixen variants poc freqüents a la població -però no tant com les anteriors- i que presenten una penetrància intermitja, com és el cas de les variants en el número de còpies (**CNV**), insercions i delecions que poden comprendre des d'una kilobase (Kb) a diverses megabases (Mb) del genoma i que conformen el 13% del genoma humà. Els CNVs poden influenciar els nivells d'expressió dels gens a través d'un efecte dependent de dosi gènica o, en ocasions, de forma directa sobre la funció. Múltiples estudis han identificat una major freqüència de CNVs en subjectes amb TDAH en comparació amb controls sans i han aportat evidències que recolzen un paper rellevant dels CNVs en la susceptibilitat del TDAH (Williams *et al.*, 2010; Elia *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2012; Stergiakouli *et al.*, 2012; Jarick *et al.*, 2014; Ramos-Quiroga *et al.*, 2014). Per últim, hi ha variants molt comuns a la població (freqüència >1%), però que mostren una magnitud d'efecte baix, és a dir, que en rares ocasions condueixen a l'aparició d'un fenotip de forma aïllada. Aquestes variants corresponen principalment a polimorfismes de nucleòtid únic (**SNP** – *Single Nucleotide Polymorphism*), que conformen el 90% de la variabilitat genètica del genoma humà i que participen habitualment en els trastorns d'etiologia complexa com el TDAH, on s'ha estimat que arribarien a explicar el 28% de la seva heretabilitat. Així, nombrosos estudis han demostrat l'important paper dels SNPs en la susceptibilitat a desenvolupar el trastorn, sobretot quan se'n combinen milers en puntuacions de risc poligènica (PRS) (Franke *et al.*, 2009; Hamshere *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium *et al.*, 2013a).

A continuació es descriuen els principals resultats obtinguts en l'estudi dels diferents tipus de variants genètiques implicades en el TDAH mitjançant diferents estratègies metodològiques.





2.1.1.1. Estudis de lligament genètic

Inicialment, l'abordatge genètic del TDAH es va basar en la realització d'estudis de lligament genètic, tot i que constitueixen una estratègia que ha anat quedant en desús amb el temps i de forma concomitant al desenvolupament de noves tecnologies d'alt rendiment (Albayrak *et al.*, 2008). En molts casos, quan es desconeixen les alteracions bioquímiques subjacents o no existeix una hipòtesi biològica prèvia, aquest tipus d'estratègia suposa el primer pas en la investigació de les bases genètiques d'un trastorn. Aquests estudis es basen en la premissa que gens localitzats físicament a prop en un cromosoma, tendeixen a mantenir-se junts durant la meiosi i que, de la mateixa manera, com més llunyans es trobin, més elevada és la probabilitat que es trenqui la seva co-segregació degut a un fenomen de recombinació entre ells. Així, els estudis de lligament mesuren el nivell d'associació entre un tret fenotípic i els marcadors genètics de regions específiques del genoma, i analitzen si la freqüència amb la que certs d'al·lels són compartits és major a la que s'esperaria per atzar entre dos familiars afectats en comparació amb els subjectes sans (Dawn Teare i Barrett, 2005; Albayrak *et al.*, 2008).

Aquests estudis poden centrar-se tant en regions candidates, com avaluar el genoma complet. Des de l'any 2002, s'han realitzat 15 estudis de lligament en l'àmbit del TDAH: dotze a escala genòmica, dos considerant regions prèviament associades i una considerant específicament el *locus* del gen de la latrofilina 3 (*LPHN3*) (Taula 3) (Li *et al.*, 2014a). De les dotze anàlisis de lligament realitzades a escala genòmica, vuit van considerar parelles de germans i quatre es van realitzar en famílies de gran llinatge.

Taula 3. Estudis de lligament genètic en TDAH.

Estudi	Mètode	Disseny	Ètnia	Mida mostral	Regions reportades (gens candidats per TDAH)
Fisher <i>et al.</i> , 2002	EG	Parelles de germans	Caucàsica	126 parelles de germans de 104 famílies	2q14, 2q24, 3q24, 4p15, 5p12, 7p15, 8p23, 9q21, 9q22, 10q26, 11q25, 12p13, 12q23, 12q24, 13q12, 13q31, 13q33, 16p13, 16q21, 21q21, Xp22
Smalley <i>et al.</i> , 2002	RC	Parelles de germans	Caucàsica	277 parelles de germans en 203 famílies	16p13
Bakker <i>et al.</i> , 2003	EG	Parelles de germans	Caucàsica	164 parelles de germans de 106 famílies	3q13.32, 4p16.3, 5p13.1, 6q26, 7p13, 9q33.3, 10cen, 13q33.3, 15q15.1s
Ogdie <i>et al.</i> , 2003	EG	Parelles de germans	Caucàsica	270 parelles de germans de 204 famílies	5p13, 6p12, 6q14, 11q13, 11q25, 15q26, 16p13 (GRIN2A, EMP2, ZNF75A) , 17p11, 17p12, 20q13
Ogdie <i>et al.</i> , 2004	RC	Parelles de germans	Caucàsica	308 parelles de germans de 226 famílies	6q12, 17p11 , 5p13
Arcos-Burgos <i>et al.</i> , 2004	EG	Familiar-Pedigrí	Paisa	16 famílies multigeneracionals	4q13.2, 5q33.3 (ADRA1B) , 8q11.23, 11q22 (MMP7, CNTN5) , 17p11 (MAP2K3)
Hebebrand <i>et al.</i> , 2006	EG	Parelles de germans	Caucàsica	155 parelles de germans	5p (FGF10, SLC6A3, SLC1A3, GDNF, HCN1, TRIO) , 6q, 7p, 8, 9q, 11q, 12q, 17p
Ogdie <i>et al.</i> , 2006	EG	Metanàlisi	Caucàsica	424 parelles de germans	5p13 (GDNF, SLC1A3)
Asherson <i>et al.</i> , 2008	EG	Parelles de germans	Caucàsica	142 parelles de germans	Chr2:181.5cM, Chr2:34.5cM, 9q22, Chr11:69cM, Chr14:100 cM, 16q12, 16q23, Chr21:61.4 cM, ChrX:141.9 cM
Faraone <i>et al.</i> , 2008	EG	Parelles de germans	Caucàsica	271 famílies amb 1170 individus	Chr8:54.2cM, Chr8:93.4cM, Chr15:51.7cM
Romanos <i>et al.</i> , 2008	EG	Familiar-Pedigrí	Caucàsica	8 famílies amb 191 individus	1q25.1, 1q25.3, 2q35, 5q13.1, 6q22-23 (IL20RA, DNAJA1P4, TAAR3) , 7q21.11, 9q22 (CDK20, NFIL3, DIRAS2) , 9q31.1-33.1 (ASTN2, TRIM32) , 9q33 (ASTN2, TRIM32) , 12p13.33, 14q12 (PRKD1) , 15q11.2-13.3 (CHRNA7) , 16p12.3-12.2 (GPRC5B) , 16q24.1, 18q11.2-12.3
Rommelse <i>et al.</i> , 2008	EG	Parelles de germans	Caucàsica	238 individus TDAH, els seus 112 germans afectats i 195 germans sans	2p25.1, 2p25.2, 2q14.3, 2q21.1 , 3p24.3, 4q35.2, 8q22.3, 9p21.2, 12p13.33, 12q23.3, 13q12.11 , 14q32.13, 17q12
Zhou <i>et al.</i> , 2008	EG	Metanàlisi	Caucàsica	2084 individus amb TDAH	5p15.32-q14.3, 6p21.1-q15, 6q15-23.2, 7p14.1-q21.11, 8p23.3, 9q21.32-31.1, 15p13, 16p13.3 (ZNF75A) , 16q23.1-24.3 (ATP2C2, CDH13) , 17p13.3
Amin <i>et al.</i> , 2009	EG	Familiar-Pedigrí	Caucàsica	9 individus amb TDAH	1p36, 5q33, 6p12, 6p22, 6q15, 15q25, 18p11, 18q21, 18q22
Vegt <i>et al.</i> , 2010	EG	Familiar-Pedigrí	Caucàsica	24 individus d'una família	7p15.1-q31.33, 14q11.2-22.3
Arcos-Burgos <i>et al.</i> , 2010	RC	Familiar-Pedigrí	Paisa i caucàsica (rèplica)	18 famílies multigeneracionals amb 433 individus, i 137 famílies nuclear amb 527 individus. Rèplica en 1410 famílies amb 6360 individus	4q13.2 (LPHN3)
Saviouk <i>et al.</i> , 2011	EG	Parelles de germans	Caucàsica	711 famílies amb 3412 individus	2p25.1 (ID2) , 3p24.3-24.1, 8p23.3-23.2, 18q21.1-22.3, 18q21.31-21.32 (CPLX4, MC4R)

Les regions estadísticament significatives es mostren en negreta. Els gens candidats per TDAH ubicats en les regions significatives es mostren entre parèntesi. Abreviacions: EG=Escala Genòmica; RC=Regions candidates.

Mitjançant aquesta estratègia, s'han identificat més de 100 regions diferents en relació al TDAH. Entre elles, 22 han mostrat una associació significativa amb el trastorn en anàlisis de lligament a escala genòmica i dues, la 6q12 i la 4q13.1, en estudis de regions candidates (Taula 3) (Ogdie *et al.*, 2004; Arcos-Burgos *et al.*, 2010). D'entre elles, els *loci* 16p13 i 17p11 són les més prometedores, ja que s'han trobat significativament lligats al TDAH en dues ocasions (Ogdie *et al.*, 2003; Smalley *et al.*, 2002; Arcos-Burgos *et al.*, 2004; Ogdie *et al.*, 2004). A més, s'ha observat que, en molts casos, les regions identificades inclouen gens candidats pel TDAH, com ara els gens que codifiquen pel transportador de

dopamina DAT1 (*SLC6A3*), la caderina 13 (*CDH13*) o el receptor ionotròpic de glutamat N-metil D-aspartat 2A (*GRIN2A*) (Li *et al.*, 2014a). En línia amb aquests resultats, un estudi recent ha combinat diverses anàlisis de lligament genètic amb estudis d'associació, considerant sis endofenotips neuropsicològics del TDAH, i ha aportat evidències addicionals sobre l'associació entre el TDAH i diversos *loci* que inclouen gens candidats pel trastorn, com ara la *LPHN3*, el factor de creixement fibroblàstic 1 (*FGF1*), l'ARN polimerasa II subunitat A (*POLR2A*), el receptor d'acetilcolina nicotínic alfa 4 (*CHRNA4*) o contenidor de domini FYVE i repeticions d'ankirina (*ANKFY1*) (Mastronardi *et al.*, 2016).

2.1.1.2. Estudis d'associació

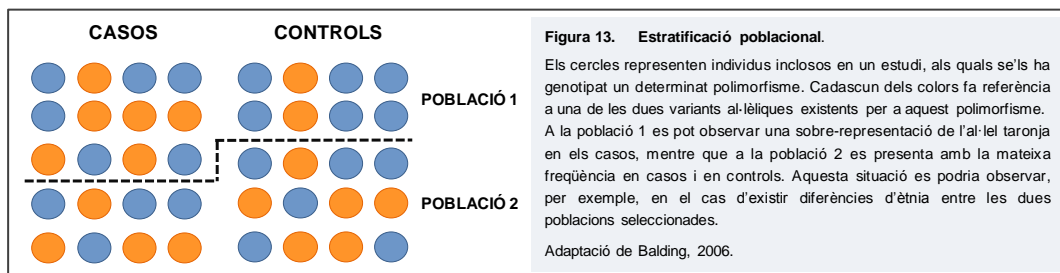
L'estratègia més àmpliament utilitzada en l'abordatge genètic del TDAH han estat els estudis d'associació, que constitueixen mètodes no paramètrics que permeten identificar gens de susceptibilitat implicats en trastorns complexos. Mitjançant taules de contingència, es comparen les freqüències al·lèliques o genotípiques d'un determinat marcador entre un grup d'individus afectes i un grup de controls. Existeixen diversos tipus d'aproximacions que permeten analitzar l'associació entre les variants genètiques i el trastorn, i que es descriuen a continuació.

Per una banda, en funció del tipus de grup control emprat, es pot diferenciar entre estudis d'associació **cas-control familiars** o **cas-control poblacionals** (Gauderman *et al.*, 1999; Evangelou *et al.*, 2006).

Estudis d'associació cas-control familiars. En aquests estudis la informació genètica dels progenitors (trio cas-progenitors) o germans (parella cas-germà) d'un individu afecte s'utilitza com a control intern. Presenten com a avantatge l'existència d'una base genètica compartida entre els familiars i una tendència a l'homogeneïtat pel que fa a l'exposició de factors ambientals, així com una tendència a evitar l'estratificació poblacional (Gauderman *et al.*, 1999; Evangelou *et al.*, 2006). Com a limitació, existeix la dificultat per aconseguir una mostra suficientment gran de famílies ben caracteritzades, raó per la qual l'aplicació d'aquesta estratègia és menys freqüent.

Estudis d'associació cas-control poblacionals. Són l'aproximació més emprada en l'estudi dels trastorns complexos i, concretament, del TDAH (Evangelou *et al.*, 2006). Com a control poblacional, s'utilitzen individus no relacionats entre ells ni amb els pacients. El grup control ha de constituir una mostra representativa de la població base de la que es van seleccionar els casos i idealment hauria de ser similar a aquesta en totes les variables excepte per la del fenotip d'estudi. El més habitual és seleccionar una mostra de controls aparellada per edat, sexe i ètnia amb el grup de casos. L'elecció de

la població control en aquest tipus d'aproximacions és crucial per tal de minimitzar la presència d'**estratificació** a la mostra, ja que això podria conduir a la detecció de diferències entre les poblacions d'estudi com a conseqüència de factors independents al fenotip d'interès, el que també s'anomena **falsos positius** o **errors de tipus α** (Figura 13).



Per altra banda, en funció de l'existència d'una hipòtesi biològica prèvia que marqui la direcció de l'estudi, també es pot distingir entre estratègies d'associació que es basen en l'anàlisi de variants polimòrfiques ubicades en **gens candidats** o en **regions cromosòmiques d'interès (CGAS)**, o aproximacions dirigides a avaluar de forma massiva variants disperses per **tot el genoma (GWAS)** (Pettersson *et al.*, 2009).

Estudis d'associació de gens o regions candidates (CGAS). Es basen en una hipòtesi prèvia que suggereixi la implicació d'un gen o regió genòmica en un determinat fenotip o patologia (Pettersson *et al.*, 2008). La selecció dels gens o regions candidates es basa habitualment en la seva funció biològica o en la seva ubicació en una regió prèviament implicada en la malaltia d'estudi a través d'estudis d'associació o de lligament genètic.

Tot i que els resultats no sempre han estat consistents, des de la publicació del primer estudi d'associació en l'àmbit del TDAH, s'han dut a terme un gran nombre d'estudis que han proposat com a candidats prop de 200 gens, dels quals, aproximadament la meitat han mostrat associació significativa en com a mínim un estudi (Taula 4) (Li *et al.*, 2014a). Tradicionalment, l'alteració de la regulació de la neurotransmissió s'ha proposat com a principal mecanisme molecular implicat en l'etiologia del TDAH, recolzat per les evidències aportades per l'efectivitat dels tractaments psicoestimulants i les dades neuroquímiques dels models animals (Cook *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2014a; Hawi *et al.*, 2015). Tot i les inconsistències observades pel que fa al mateix *locus*, s'han identificat gens que formen part de certes vies i sistemes que demostrat evidències fermes d'associació amb el TDAH. En primer lloc, s'han identificat de forma consistent els sistemes de neurotransmissió dopaminèrgica, noradrenèrgica i

serotoninèrgica. Alguns dels principals gens implicats codifiquen per: els receptors de dopamina 1, 4 i 5 (*DRD1*, *DRD4* i *DRD5*), el transportador de dopamina DAT1 (*SCL6A3*), el transportador de norepinefrina NET1 (*SLC6A2*), el receptor adrenèrgic alfa 2B (*ADRA2B*), el transportador de serotonina 1 (*SLC6A4*), els receptors de serotonina 2A i 2B (*HTR2A* i *HTR1B*) i els enzims dopamina- β -hidroxilasa (*DBH*), catecol-O-metiltransferasa (*COMT*), monoamino oxidasa B (*MAOB*) i dopa descarboxilasa (*DDC*) (Ribasés *et al.*, 2009a; Ribasés *et al.*, 2012; Hawi *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014a; Hawi *et al.*, 2015). En un dels estudis d'associació més significatius es van avaluar 51 gens dels sistemes dopaminèrgic, noradrenèrgic i serotoninèrgic, i es van identificar 18 gens candidats potencialment implicats en el trastorn (Brookes *et al.*, 2006). També s'han identificat gens implicats en l'alliberació de neurotransmissors a l'espai sinàptic, com ara aquells que codifiquen per la proteïna SNAP25 (*SNAP25*), la sinaptotagmina 2 (*SYT2*) i la sintaxina 1A (*STX1A*), del complex *SNARE*, així com gens que codifiquen per a factors neurotròfics, com el receptor del factor neurotròfic ciliar (*CNTFR*), la neurotrofina 3 (*NTF3*), el receptor neurotròfic tirosin-quinasa 2 (*NTRK2*) o el factor neurotròfic cerebral (*BDNF*) (Ribasés *et al.*, 2008; Sánchez-Mora *et al.*, 2013). Altres gens destacats identificats a través d'aquest abordatge inclouen, per exemple, aquells que codifiquen per la latrofilina 3 (*LPHN3*), implicada en l'adhesió i la senyalització cel·lulars, l'intercanviador NHE9 (*SLC9A9*) o la proteïna associada a BAI1 2 (*BAIAP2*), implicada en la lateralització cerebral (Ribasés *et al.*, 2009b i 2011; de Silva *et al.*, 2003; Arcos-Burgos *et al.*, 2010).

Taula 4. Resultats de l'avaluació sistemàtica de gens candidats per TDAH de l'estudi Li *et al.*, 2014a.

Gen	Ubicació	Número de marcadors ^a	Número d'estudis ^b	Avaluació sistemàtica de Li <i>et al.</i> , 2014a		
				Gen candidat ^c	Gen amb múltiples evidències ^d	Gen prioritzat ^e
<i>SLC6A3</i>	5p15.3	19	70 (43/1/26)	Sí	CGAS, Lligament	Entrenament
<i>DRD4</i>	11p15.5	9	67 (49/0/18)	Sí		Entrenament
<i>COMT</i>	22q11.21	10	29 (7/0/22)	Sí	CGAS, CNV	-
<i>SLC6A4</i>	17q11.2	5	26 (13/0/13)	Sí	-	Prioritzat
<i>DRD5</i>	4p16.1	7	22 (14/2/6)	Sí	-	-
<i>SNAP25</i>	20p12-p11.2	34	21 (16/0/5)	Sí	-	Entrenament
<i>DBH</i>	9q34	21	21 (12/0/9)	Sí	-	Prioritzat
<i>MAOA</i>	Xp11.4-p11.3	18	20 (13/0/7)	Sí	-	Entrenament
<i>SLC6A2</i>	16q12.2	52	16 (10/1/5)	Sí	-	Entrenament
<i>BDNF</i>	11p14.1	8	16 (8/0/8)	Sí	-	-
<i>HTR1B</i>	6q13	4	14 (5/0/9)	Sí	-	Prioritzat
<i>HTR2A</i>	13q14-q21	4	13 (7/0/6)	Sí	-	Prioritzat
<i>ADRA2A</i>	10q25.2	4	13 (4/0/9)	Sí	-	-
<i>TPH2</i>	12q15	8	11 (8/0/3)	Sí		Entrenament
<i>DRD2</i>	11q22-q23	4	10 (3/0/7)	Sí	CGAS, Lligament	Prioritzat
<i>DRD1</i>	5q34-q35	9	8 (5/0/3)	Sí	-	-

Gen	Ubicació	Número de marcadors ^α	Número d'estudis ^β	Avaluació sistemàtica de Li et al., 2014a		
				Gen candidat ^γ	Gen amb múltiples evidències ^δ	Gen prioritzat ^ε
<i>DRD3</i>	3q13.3	2	8 (1/0/7)	Sí	-	Prioritzat
<i>CHRNA4</i>	20q13.33	4	7 (4/0/3)	Sí	-	Entrenament
<i>ADRA2C</i>	4p16.3	3	7 (2/1/4)	Sí	-	-
<i>TH</i>	11p15.5	2	7 (2/0/5)	Sí	-	Prioritzat
<i>DDC</i>	7p12.1	3	6 (5/0/1)	Sí	-	Entrenament
<i>MAOB</i>	Xp11.4-p11.3	3	6 (2/0/4)	Sí	-	-
<i>TPH1</i>	11p15.3-p14	2	6 (2/0/4)	Sí	-	-
<i>HTR2C</i>	Xq23	3	5 (2/0/3)	Sí	-	Prioritzat
<i>SYP</i>	Xp11.23-p11.22	3	4 (4/0/0)	-	-	Entrenament
<i>LPHN3</i>	4q13.1	7	4 (3/1/0)	-	CGAS, Lligament	-
<i>SYT1</i>	12q21.2	2	4 (2/0/2)	-	-	Prioritzat
<i>CDH13</i>	16q23.3	7	4 (1/1/2)	-	Lligament, GWAS, CNV	-
<i>GRIN2A</i>	16p13.2	5	4 (1/0/3)	-	CGAS, Lligament	-
<i>FADS2</i>	11q12.2	4	3 (3/0/0)	-	CGAS, Lligament	Entrenament
<i>GRM7</i>	3p26-p25	2	3 (2/0/1)	-	CGAS, CNV	-
<i>PNMT</i>	17q	3	3 (2/0/1)	-	-	Entrenament
<i>STX1A</i>	7q11.2	4	3 (2/0/1)	-	-	Prioritzat
<i>HTR3B</i>	11q23.1	2	3 (1/0/2)	-	CGAS, Lligament	-
<i>HTR1A</i>	5q11.2-q13	5	2 (2/0/0)	-	-	Prioritzat
<i>HTR1E</i>	6q14-q15	2	2 (2/0/0)	-	-	Entrenament
<i>SLC9A9</i>	3q23-q24	25	2 (2/0/0)	-	CGAS, GWAS	Entrenament
<i>CPLX2</i>	5q35.2	2	2 (1/1/0)	-	CGAS, CNV	-
<i>GRM5</i>	11q14.3	1	2 (1/1/0)	-	Lligament, GWAS, CNV	-
<i>ADRA1B</i>	5q33.3	11	2(1/0/1)	-	CGAS, Lligament	-
<i>ADRB2</i>	5q31-q32	1	2(1/0/1)	-	-	Prioritzat
<i>CALY</i>	10q26.3	5	2(1/0/1)	-	CGAS, CNV	-
<i>FTO</i>	16q12.2	2	2(1/0/1)	-	CGAS, CNV	-
<i>SLC1A3</i>	5p13	20	2(1/0/1)	-	CGAS, Lligament	-
<i>ASTN2</i>	9q33	NA	2(0/2/0)	-	Lligament, GWAS	-
<i>EMP2</i>	16p13.2	NA	2(0/2/0)	-	Lligament, GWAS	-
<i>ATP2C2</i>	16q24.1	1	2(0/1/1)	-	Lligament, GWAS, CNV	-
<i>CHRNA7</i>	15q13.3	3	2(0/1/1)	-	Lligament, CNV	-
<i>PRKG1</i>	10q11.2	1	2(0/1/1)	-	GWAS, CNV	-
<i>ADRB1</i>	10q25.3	2	2(0/0/2)	-	-	-
<i>SLC18A2</i>	10q25	1	2(0/0/2)	-	-	-
<i>VAMP2</i>	17p13.1	6	2(0/0/2)	-	-	-
<i>ARVCF</i>	22q11.21	8	1(1/0/0)	-	CGAS, CNV	-
<i>BCHE</i>	3q26.1-q26.2	12	1(1/0/0)	-	CGAS, CNV	-
<i>CCSER1</i>	4q22.1	4	1(1/0/0)	-	CGAS, CNV	-
<i>CNTF</i>	11q12	1	1(1/0/0)	-	CGAS, Lligament	-
<i>CPLX4</i>	18q21.32	2	1(1/0/0)	-	CGAS, Lligament	-
<i>DIRAS2</i>	9q22.32	12	1(1/0/0)	-	CGAS, Lligament	-
<i>GPRC5B</i>	16p12	1	1(1/0/0)	-	CGAS, Lligament	-

Gen	Ubicació	Número de marcadors ^α	Número d'estudis ^β	Avaluació sistemàtica de Li <i>et al.</i> , 2014a		
				Gen candidat ^γ	Gen amb múltiples evidències ^δ	Gen prioritzat ^ε
HES1	3q28-q29	1	1(1/0/0)	-	CGAS, CNV	-
NOS1	12q24.22	1	1(1/0/0)	-	CGAS, GWAS	-
SPOCK3	4q32.3	40	1(1/0/0)	-	CGAS, CNV	-
DNM1	9q34	NA	1(0/1/0)	-	-	-
IL20RA	6q23.3	1	1(0/1/0)	-	Lligament, GWAS	-
MMP7	11q21-q22	1	1(0/1/0)	-	Lligament, GWAS	-
TCERG1L	10q26.3	NA	1(0/1/0)	-	GWAS, CNV	-
TRIO	5p14-p15.1	1	1(0/1/0)	-	Lligament, GWAS	-
CHRNA3	15q24	1	1(0/0/1)	-	-	-
HTR3A	11q23.1-q23.2	2	1(0/0/1)	-	-	-

^α Total de marcadors investigats per diferents estudis en la regió d'un gen, incloent SNPs, VNTRs, microsatèl·lits, STR, duplicacions, etc. Quan s'ha reportat directament el gen a través de GWAS, estudis de lligament o de CNVs, el valor és NA.

^β Correspon a "número total d'estudis realitzats d'aquest gen (número d'estudis amb resultats significatius/número d'estudis demostrant tendència a l'associació/número d'estudis amb resultats no significatius).

^γ Correspon a una visió global dels resultats dels estudis de genètica molecular realitzats sobre aquest gen. "SI" indica que s'han reportat resultats significatius en cinc o més estudis.

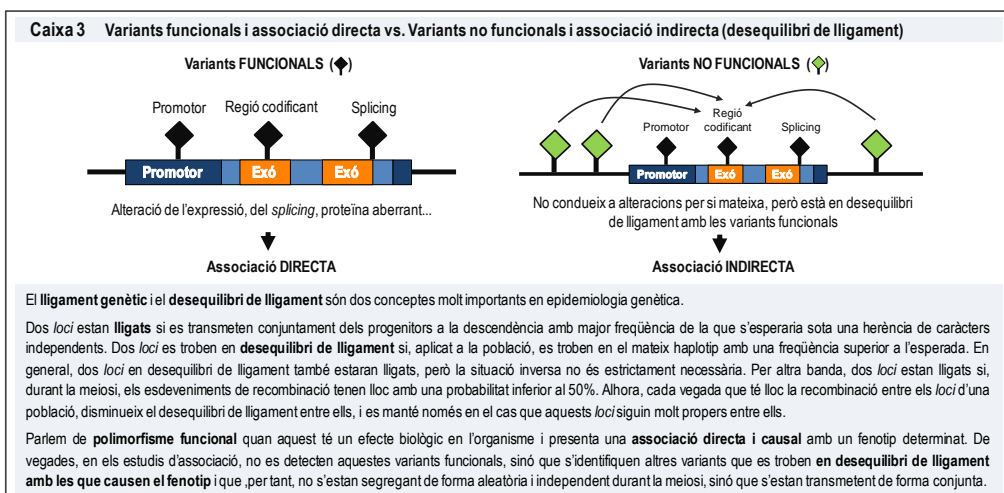
^δ Fa referència als gens que han mostrat evidències d'associació en més d'una aproximació: "CGAS" indica gens reportats mitjançant estudis d'associació de gens candidats; "GWAS" indica gens reportats per GWAS o que contenen variants que han demostrat una associació significativa o tendència en GWAS; "Lligament" fa referència a gens ubicats en regions significativament associades; "CNV" fa referència a gens ubicats en CNVs significativament associats.

^ε Fa referència als resultats de l'anàlisi de prioritització dels gens candidats per TDAH realitzada per Li *et al.* "Prioritzat" indica gens molt prometedors, i "Entrenament" indica gens amb potencial.

Estudis d'associació a escala genòmica (GWAS). Es tracta d'una aproximació lliure d'hipòtesi en la que s'avaluen variants de l'ordre de centenars de milers o milions, repartides per tot el genoma. Aquests estudis han estat possibles gràcies als recents avenços en l'àmbit de la tecnologia de genotipació d'última generació basada en *microarrays*, que permet genotipar de forma rutinària un elevadíssim número de variants, en mostres prou grans com per a poder detectar efectes genètics moderats. Lligat a aquests avenços tecnològics, diversos recursos i bases de dades han posat a disposició pública informació detallada sobre els genomes de milers d'individus de múltiples poblacions, facilitant dades sobre els genotips de milions de SNPs i dels seus patrons de desequilibri de lligament (LD). El coneixement dels patrons de LD del genoma en una població permet seleccionar col·leccions de SNPs que capturin la major part de la variabilitat genètica de la regió genòmica que es vol estudiar, evitant recollir informació redundant i fent possible la reducció del número de SNPs a genotipar sense pèrdua d'informació, el que es tradueix en una reducció de la despesa econòmica (Balding DJ, 2006). A més, aquesta informació és molt important si tenim present que existeixen tant SNPs que són funcionalment rellevants i estan directament associats amb la fisiopatologia del trastorn d'estudi, com SNPs que a priori no tenen repercussió funcional, però que estan en LD amb la variant funcional i que, per tant, s'associen de forma indirecta amb la patologia (Caixa 3). En aquest sentit, el recurs més rellevant actualment és el

Projecte 1000 Genomes (1000 Genomes Project Consortium, 2015; <http://www.internationalgenome.org/>), un projecte internacional col·laboratiu que posa a l'abast dades sobre més de 84 milions de SNPs provinents de 2504 individus de 26 poblacions diferents. L'ús de la informació d'aquests panells de referència ha permès desenvolupar mètodes computacionals que permeten inferir els al·lels de les variants que no han estat directament genotipades en un estudi, procés que rep el nom d'**imputació**. Així, tot i que una potencial variant causal no hagi estat genotipada en un estudi concret, probablement sí que ho hagi estat en les poblacions del Projecte 1000 Genomes i, per tant, pot ser imputada i considerada en els estudis d'associació (Halperin i Stephan, 2009).

Aquest escenari, sumat a l'existència de certes limitacions en relació als resultats obtinguts mitjançant abordatges genètics basats en gens candidats i estudis de lligament, ha estimulat la realització de GWAS en l'estudi dels trastorns complexos i, concretament, del TDAH. En els darrers anys, s'han realitzat múltiples GWAS tant en població adulta amb TDAH com en població infantil (Taula 5). En total, s'han realitzat sis estudis GWAS de tipus cas-control, quatre d'ells en població infantil de TDAH, un en població adulta i un considerant ambdues poblacions (Neale *et al.*, 2010a; Hinney *et al.*, 2011; Stergiakouli *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013; Lesch *et al.*, 2008, Zayats *et al.*, 2015). S'han realitzat dos GWAS basats en famílies considerant infants amb TDAH, i dos estudis de trets quantitius que han avaluat la simptomatologia del trastorn en una mostra de TDAH infantil i en una cohort de població general d'adolescents i adults, respectivament (Neale *et al.*, 2008; Mick *et al.*, 2010; Lasky-Su *et al.*, 2008a; Ebejer *et al.*, 2013). Addicionalment, també s'han realitzat estudis GWAS que han avaluat l'atenció en població adulta amb TDAH, les funcions motores en població infantil o l'edat d'aparició del trastorn (Alemany *et al.*, 2015; Fliers *et al.*, 2012; Lasky-Su *et al.*, 2008b).



Taula 5. Estudis d'associació a escala genòmica (GWAS) en TDAH.

Estudi	Disseny	Mostra	Número de SNPs*	Gens reportats	
				Basat en SNP (P<1e-05)	Basat en gen/regió (reportats)
Lesch <i>et al.</i> , 2008	Cas-control	TDAH adult 343 casos 304 controls	504.219	MOBP, GPC6, C9orf98, ITGA11, ITGAE, ASTN2, MGC33657, CSMD2, AK094352, ATP2C2, MAN2A2, DNMT1, MAP1B, TLL2, TFEF, MMP24, UNC5B, C10orf79, CREB5, NT5DC3, SUPT3H, PPM1F, CDH13, REEP5, MYT1L, CRYGC, CTNNA2	KALRN, ZNF354C, WRNIP1, GRB10, DPP6, ARHGAP22, RAB38, FAT3, DA259379, NT5DC3
Neale <i>et al.</i> , 2008	Familiar	TDAH infantil 958 trios	438.784	No significatiu	No significatiu
Lasky-Su <i>et al.</i> , 2008a	Familiar Edat d'aparició	TDAH infantil 958 trios	429.981	ADAMTS2, SULF2	-
Lasky-Su <i>et al.</i> , 2008b	Familiar Trets quantitativus simptomatologia	TDAH infantil 958 trios	429.981	EREG, HAS3, ZNF544, NAPRT, CLYBL, OXER1, DMRT2, GRIK1, LOC390980, IL16, FLJ34870, FHIT, FOXP1, LPL, SLCO3A1, ZNF423	-
Mick <i>et al.</i> , 2010	Familiar	TDAH infantil 735 trios	835.136	C21orf34, EMP2, CCDC46, BMPR1B, ATPBD4, LOC389365, UGT1A9, SLC9A9, ELOVL6, LOC643308, TMEM16E	SLC9A9, SNK1E, ARRB1, FADS1, NFIL3, FADS2
Neale <i>et al.</i> , 2010a	Cas-control	TDAH infantil 1.150 casos 2.653 controls 4 mostres	1.033.244 (imputats)	PRKG1, FLNC, TCERG1L, PPM1H	-
Neale <i>et al.</i> , 2010b	Metanàlisi	TDAH infantil 2.064 trios (896 casos, 2.455 controls)	1.206.462 (imputats)	CHMP7	-
Hinney <i>et al.</i> , 2011	Cas-control	TDAH infantil 495 casos 1.300 controls	487.484	BCL11A, GRM5, KIAA1267, PSMC3, CLASP2	-
Stergiakouli <i>et al.</i> , 2012	Cas-control	TDAH infantil 799 casos 6.000 controls	502.702	IL20RA, HOXB1, TRIO, MAGI2, ATXN2	-
Fliers <i>et al.</i> , 2012	Familiar Funcions motores	TDAH infantil 958 trios	2.543.285 (imputats)	SLC7A2	-
Yang <i>et al.</i> , 2013	Cas-control	TDAH infantil 1.040 casos 963 controls Cohort poblacional adolescent i adulta	656.051	NCL, TMX3, ARSB, GRIK4	-
Ebejer <i>et al.</i> , 2013	Trets quantitativus simptomatologia	3.236 individus, rèplica en 953 individus	2,373,249 (imputats)	CPLX2, GPR139, DNMT3B, MAPRE1, LINC01183, PARD3B, MAPRE1, FRMD1	GPR139, C10orf81, ARCN1, FAM55A, REG1A
Zayats <i>et al.</i> , 2015	Cas-control	TDAH infantil i adult 478 casos 880 controls	598.384	TRIM36, ZBTB16, ENSG00000263745	CCRN4L, ALG5, EXOSC8, SUPT20H, OR3A1, SAFB2, SHANK1, HOGA1, RPL13, ISM1, KLHL40, HHATL, SUPT4H1, SH3BP5, POU4F1, TRIM36, C16orf58
Alemaný <i>et al.</i> , 2015	Tret quantitativu agressivitat d'atenció	TDAH adult 479 individus	799.713	ACOXL, SORCS2, NUA1, LOC286114, ASB17, BC037384, DST, ACOXL, ZNF831, NUA1, ZNF622, FGF20, MSH4, BTBD9, DLG2, LOC440970, CAAP1, TOP3B, CHRNB4, MIR572, SALL3, NELL1, BC030092, ARHGEF3, NBPF22P	CDH6, CLEC4C, FPGT-TNN3K, SRD5A3, LRR1Q3, POLR2I, UGT2B28, NRCAM, MRAP2, KCNK3, MYRF, FAM159B, SUPT3H, NXN, CERS4, IMPG1, BATF, PRDM16, GJC2, THAP8, CACNA1E, vash1, LCA5, Itc21a, FCRL5, NEPRO, TULP3, TEX9, LRR674A, KAT14, GPR137C, NSMCE1, NME2, MNS1, GPX6, NFAT5, POTEH, pcp1, ALK, RUNX2, B3GNT2, SNRPN, TPPP, CA8, CD200R1, ADAM12, DDAH1, GPX5, FCRL1, MITD1, KNSTRN, WDR62, DEFB116, FAM117A, ADCY3, CEP19, LTBP2, c4b, FNDC11, FPGT, TBCB, UBR7, TCF7L1, TEPP, SYT9, ADAM26, TMBIM4, KCN5, PLCG2, CD109, PRRX2, WDFY2
Brevik <i>et al.</i> , 2016	Tret quantitativu agressivitat Metanàlisi	TDAH 1.060 casos adults i 750 infantils	7.576.458 (imputats) 1.871.025 (imputats) (infantil)	ST18, C9orf47, SUPT3H, ATP5G2P2, EDN1, TLL8, SUPT3H, MAP10, ADAM12, MLLT1, BMP7 Metanàlisi: NTM, CSMD1, TEPP, CPNE4, MICAL2, H3F3A, ACBD3, KRT18P42, SPINK2, PHLPP1, UFM1	
Middeldorp <i>et al.</i> , 2016	Tret quantitativu simptomatologia Metanàlisi	9 cohorts poblacionals infantils 17.666 infantils	5.260.671- 6.245.251	PBX4, ACTR3B, CALD1, LMOD2, FOXN3, LRRTM4, CUX1, NRL, ARHGEF12	LMOD2, WASL, ASB15

Mitjançant estudis GWAS, s'han reportat evidències suggestives que recolzen la participació en el TDAH de gens implicats en l'adhesió cel·lular (com ara *CDH13*, astrotactina 2 (*ASTN2*) i integrina alfa E (*ITGAE*)), en la neurotransmissió (com el receptor cannabinoide *CNR1*, el receptor colinèrgic nicotínic *CHRNA7*, el receptor metabotrópic de glutamat *GRM5*, l'intercanviador *SLC9A9* o la proteïna del sinaptosoma *SNAP25*) i en la regulació de la plasticitat sinàptica (com la catenina alfa 2 (*CTNNA2*) i la kalirina (*KALRN*)), alguns dels quals es troben ubicats en regions que havien mostrat indicis de lligament amb el trastorn o que s'havien detectat en estudis de gens candidats o CNVs. També s'han identificat diversos canals de potassi i proteïnes relacionades que han mostrat associació suggestiva amb el TDAH. Addicionalment, també s'ha reportat l'associació suggestiva entre la simptomatologia del TDAH i el gen *CDH13* i el gen que codifica per l'enzim glucosa-fructosa oxidoreductasa domini 1 (*GFOD1*) (Taula 4 i 5) (Sharp *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2014a; Hawi *et al.*, 2015).

Malauradament, cap dels estudis realitzats fins al moment ha identificat associacions que superin el llindar de significació genòmica ($P < 5e-08$), tot i que sí s'han detectat senyals que mostraven tendència a l'associació ($P < 5e-05$) (Dudbridge i Gusnanto, 2008; Li *et al.*, 2014a; Hawi *et al.*, 2015). Per aquesta raó, diversos estudis han apostat per complementar l'estudi de marcadors únics dels GWAS (**anàlisis basades en SNPs**) amb estratègies d'anàlisi que consideren la significació global d'un conjunt de marcadors en una determinada regió (**anàlisis basades en gens**) o d'un conjunt de gens dins d'una categoria funcional o d'una via de senyalització gènica (**anàlisis basades en grups o anàlisis de vies**). Aquests últims, a més, permeten calcular l'**enriquiment** o **sobre-representació** de gens implicats en una funció o via particular. Combinar els efectes de múltiples variants o de gens, alhora que reduir el nombre de comparacions realitzades, es presenta com a una estratègia prometedora per l'abordatge de la complexitat genètica dels trastorns complexos. Els estudis que han aplicat aquestes aproximacions en el TDAH, han pogut identificar nous gens i vies de senyalització implicats en el trastorn, i han aportat evidències que recolzen la poligenicitat de la seva etiologia (Taula 5 i 6).

Per altra banda, combinant dades de GWAS i anàlisi de vies de senyalització, s'han identificat gens associats al TDAH implicats en la regulació de l'expressió gènica, en l'adhesió cel·lular i la inflamació, així com també gens candidats que havien estat prèviament associats al trastorn (*SLC9A9* i triptòfan hidroxilasa 2 (*TPH2*)) (Zayats *et al.*, 2015; Hawi *et al.*, 2015). També s'ha detectat enriquiment per a vies de senyalització funcionalment rellevants en l'endofenotip atencional del TDAH, com ara el sistema ubiquitina-proteosoma, la guia axonal o els trastorns neurodegeneratius (Alemany *et al.*, 2015). Mitjançant anàlisis de vies i xarxes, integrant els millors resultats obtinguts a través de diferents GWAS,

s'ha identificat enriquiment per gens implicats en el creixement dirigit de neurites, els trastorns neurològics, i el desenvolupament i la funció del SNC (Poelmans *et al.*, 2011; Hawi *et al.*, 2015) (Taula 5). Per últim, s'han implicat els mecanismes d'adhesió cel·lular i de regulació de l'expressió gènica en l'etiologia de l'agressivitat en el TDAH infantil (Brevik *et al.*, 2016).

Taula 6. Resultats dels estudis d'enriquiment de vies de senyalització considerant les associacions més significatives identificades mitjançant GWAS en TDAH en l'estudi de Hawi *et al.*, 2015.

Categoria	P-valor	Procés biològic	Gens
GO:0007399	5,06e-04	Desenvolupament del sistema nerviós	MOBP, AK8, PTCH1, BCL11A, CPLX2, MAP1B, GRM5, RHOC, TGFB2, ZNF423, DNMT3B, GRIK1, UNC5B, NDN, NR4A2, FOXP1, HOXB1, TRIO, MYT1L, MAGI2, ATXN2, CLASP2, CTNNA2, ARSB
GO:0048812 ^a	2,56e-03	Morfogènesi de les projeccions neuronals	BCL11A, MAP1B, RHOC, TGFB2, UNC5B, NDN, NR4A2, FOXP1, TRIO, ATXN2, CLASP2, CTNNA2
GO:0007409 ^b	3,80e-03	Axonogènesi	BCL11A, MAP1B, RHOC, TGFB2, UNC5B, NDN, NR4A2, FOXP1, TRIO, CLASP2, CTNNA2
GO:0048731	4,80e-03	Desenvolupament sistèmic	CDH13, MOBP, AK8, ITGA11, PTCH1, BCL11A, PTHLH, CPLX2, MAP1B, GRM5, RDH10, RHOC, TGFB2, TFEF, ZNF423, DNMT3B, GRIK1, UNC5B, MEIS2, CREB5, DMRT2, NDN, NR4A2, FOXP1, HOXB1, TRIO, MYT1L, CRYGC, EREG, MAGI2, ATXN2, CLASP2, CTNNA2, ARSB
GO:0060560	6,26e-03	Creixement del desenvolupament implicat en la morfogènesi	BCL11A, PTHLH, MAP1B, RDH10, NDN, MAGI2
GO:0007275 ^w	6,67e-03	Desenvolupament multicel·lular de l'organisme	CDH13, MOBP, AK8, ITGA11, PTCH1, BCL11A, PTHLH, CPLX2, MAP1B, GRM5, TLL2, RDH10, RHOC, TGFB2, TFEF, ZNF423, DNMT3B, GRIK1, UNC5B, MEIS2, CREB5, DMRT2, NDN, NR4A2, FOXP1, HOXB1, TRIO, MYT1L, TSHZ2, CRYGC, EREG, MAGI2, ATXN2, PSMC3, CLASP2, CTNNA2, ARSB
GO:0031175 ^o	6,73e-03	Desenvolupament de les projeccions neuronals	BCL11A, MAP1B, RHOC, TGFB2, UNC5B, NDN, NR4A2, FOXP1, TRIO, MAGI2, ATXN2, CLASP2, CTNNA2
GO:0048589	7,57e-03	Creixement del desenvolupament	BCL11A, PTHLH, MAP1B, RDH10, NDN, FOXP1, EREG, MAGI2
GO:0048699 ^w	1,40e-02	Generació de neurones	PTCH1, BCL11A, MAP1B, GRM5, RHOC, TGFB2, DNMT3B, UNC5B, NDN, NR4A2, FOXP1, TRIO, MAGI2, ATXN2, CLASP2, CTNNA2
GO:0040007	1,54e-02	Creixement	CDH13, PTCH1, BCL11A, PTHLH, MAP1B, RDH10, TGFB2, NDN, PPM1F, FOXP1, EREG, MAGI2, ATXN2
GO:0030182	1,96e-02	Diferenciació neuronal	PTCH1, BCL11A, MAP1B, RHOC, TGFB2, DNMT3B, UNC5B, NDN, NR4A2, FOXP1, TRIO, MAGI2, ATXN2, CLASP2, CTNNA2
KEGG:04724	2,71e-02	Sinapsi glutamatèrgica	GRM5, GRIK1, GRIK4
GO:0043616	3,06e-02	Proliferació de queratinòcids	CDH13, PTCH1, EREG
KEGG:03050	3,87e-02	Poteosoma	SHFM1, PSMC3
GO:0030030	4,31e-02	Organització de les projeccions cel·lulars	CDH13, BCL11A, MAP1B, RHOC, TGFB2, UNC5B, NDN, NR4A2, FOXP1, TRIO, MAGI2, ATXN2, CLASP2, CTNNA2

Abreviatures: GO, gene ontology; KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

^a El mateix grup de gens també va mostrar enriquiment per "morfogènesi de les projeccions cel·lulars" (GO: 0048858, P=1,90e-02) i "morfogènesi d'una part cel·lular" (GO:0032990, P=2,30e-02).

^b El mateix grup de gens va mostrar enriquiment per "desenvolupament axonal" (GO: 0061564, P=5,20e-03) i "morfogènesi cel·lular en la diferenciació neuronal" (GO: 0048667, P=1,04e-02).

^o El mateix grup de gens va mostrar enriquiment per "desenvolupament neuronal" (GO: 0048666, P=2,61e-02).

^w El mateix grup de gens va mostrar enriquiment per neurogènesi (GO:0022008, P=2,66e-02) i, amb algunes excepcions, per processos de desenvolupament d'un únic organisme (GO:0048856, P= 4,85e-02), desenvolupament de l'estructura anatòmica (GO:0048856, P=4,85e-02) i processos d'un únic organisme multicel·lular (GO:0044707, P=5,00e-02).

2.1.1.3. Estudis de variacions en el número de còpies (CNVs)

A més de la contribució de les variants comunes, també juguen un paper important en l'etiologia del TDAH variants genètiques amb una freqüència molt baixa a la població, però amb un efecte de moderat a gran, com els CNVs (Taula 7) (Sharp *et al.*, 2009; Banaschewski *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014a; Faraone

et al., 2015; Hawi *et al.*, 2015). S'ha reportat que el 15,6% dels individus amb TDAH serien portadors de CNVs grans, de més 500Kb, en comparació amb el 7,5% dels controls (Williams *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2012). En conjunt, els estudis de CNVs han identificat gens associats amb el TDAH ubicats a les regions 16p13.11 i 15q11-15q13, com ara el gen *CHRNA7*, implicat en les vies de senyalització nicotínica neuronal i amb potencial efecte sobre l'atenció (Williams *et al.*, 2012; Demeter i Sarter, 2013). Altres investigacions també han identificat gens que codifiquen per a receptors glutamatèrgics, com el *GRM5* i el *GRM7*, el gen que codifica per al neuropèptid Y (*NPY*), implicat en la senyalització al SNC i al sistema nerviós autònom, o el gen que codifica per la parkina (*PARK2*), una E3 ubiquitin ligasa que s'ha associat a diferents trastorns neurològics i psiquiàtrics (Elia *et al.*, 2010; Elia *et al.*, 2011; Lesch *et al.*, 2011; Sharp *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2016; Jarick *et al.*, 2014). També s'han identificat gens continguts en els CNVs associats a TDAH que participen en l'aprenentatge, la conducta, la neurotransmissió i el desenvolupament neuronal (Li *et al.*, 2014a). Per altra banda, en el primer GWAS realitzat en població xinesa Han, es va detectar un increment de la càrrega deguda a CNVs rars i un component poligènic de SNPs, així com també enriquiment de categories funcionals relacionades amb les projeccions neuronals i els components sinàptics (Yang *et al.*, 2013). A més, en línia amb les evidències que suggereixen l'existència d'una base genètica compartida entre els diferents trastorns psiquiàtrics, molts dels CNVs que s'han trobat associats al TDAH, també han estat implicats en l'autisme o l'esquizofrènia, entre d'altres trastorns (Sharp *et al.*, 2009; Banaschewski *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014a; Faraone *et al.*, 2015; Hawi *et al.*, 2015).

Taula 7. Anàlisi de CNVs a escala genòmica en TDAH.

Estudi	Disseny	Ètnia	Mostra	Mida mostral	CNVs reportats ^a	CNVs <i>de novo</i>
Elia <i>et al.</i> , 2010	Cas-control i basat en famílies	Caucàsic	Infantils i adolescents	335 trios i 2.026 controls	222	NA
Lesch <i>et al.</i> , 2011	Cas-control i basat en famílies	Caucàsic	Infantils i adolescents	99 casos i 100 controls	17	2
Williams <i>et al.</i> , 2010	Cas-control	Caucàsic	Infantils i adolescents	410 casos i 1.156 controls (1.958 British Birth Cohort)	57	6
Lionel <i>et al.</i> , 2011	Cas-control	Barreja	Infantils i adolescents	248 probis i 2.357 controls	23	4
Elia <i>et al.</i> , 2012	Cas-control	Caucàsic	Infantils i adolescents	1.013 casos i 4.105 controls	19	12
Stergiakouli <i>et al.</i> , 2012	Cas-control	Caucàsic	Infantils i adolescents	799 casos i 6.000 controls	0	0
Williams <i>et al.</i> , 2012	Cas-control	Caucàsic	Infantils i adolescents	896 casos i 2.455 controls	460	NA
Yang <i>et al.</i> , 2013	Cas-control	Caucàsic	Infantils i adolescents	1.040 casos i 963 controls	6	NA
Jarick <i>et al.</i> , 2014	Cas-control	Caucàsic	Infantils i adolescents	489 casos i 1.285 controls	50	NA
Ramos-Quiroga <i>et al.</i> , 2014	Cas-control	Caucàsic	Adults	400 casos i 526 controls	367	NA

^a Número de CNVs identificats només en individus amb TDAH. NA= Indica que no es van reportar CNVs *de novo* en l'estudi. Reproducció de Li *et al.*, 2014a.

2.1.1.4 Estudis genètics de metanàlisi

Els estudis de metanàlisi són una estratègia estadística que es basa en la combinació sistemàtica dels resultats de múltiples estudis per tal de generar conclusions més consistents. Els resultats d'aquesta metodologia tenen, *a priori*, un major poder estadístic en comparació amb els d'una anàlisi aïllada, degut a l'augment de la mida mostral, a una major diversitat entre els subjectes i a l'acumulació d'efectes i resultats. Tanmateix, també presenten certes limitacions, com ara l'heterogènia de les poblacions estudiades, o l'apropiada selecció dels estudis a considerar, ja que no tots aporten dades adequades per a incloure-les en l'anàlisi.

En l'àmbit del TDAH s'han realitzat múltiples estudis de metanàlisi que han avaluat tant el trastorn com la seva simptomatologia, i que han considerat tant estudis de lligament, com estudis d'associació basats en gens candidats o GWAS. Per exemple, la combinació dels resultats de diversos estudis de lligament a escala genòmica en dues metanàlisis va permetre la identificació de dues regions cromosòmiques lligades al TDAH, la regió 5p13, i la regió 16q23.1 (Taula 3) (Ogdie *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2008). Les metanàlisis que han considerat estudis d'associació cas-control basats en gens candidats han aportat evidències addicionals que recolzen el paper en el TDAH dels gens candidats *DAT1*, *DRD4*, *DRD5*, *DBH*, *HTR1B*, *COMT*, *SNAP25*, *SLC6A3* i *SLC6A4* (Taula 4) (Faraone *et al.*, 2004; Purper-Ouakil *et al.*, 2005; Cheuk i Wong, 2006; Li *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007; Forero *et al.*, 2009; Gizer *et al.*, 2009; Nikolaidis i Gray, 2010; Sánchez-mora *et al.*, 2010; Smith TF, 2010). Pel que fa a les metanàlisis considerant dades de GWAS, s'han realitzat quatre estudis avaluant el trastorn o la simptomatologia associada, tant en mostres de TDAH com en cohorts poblacionals (Taula 5). Alguns dels principals resultats inclouen els gens que codifiquen per a la proteïna del cos multivesicular carregat (*CHMP7*), implicada en el tràfic endosomal, la proteïna repetició ankirina amb caixa SOCS 15 (*ASB15*), implicada en el procés d'ubiquitinació, la proteïna similar a la síndrome Wiskott-Aldrich (*WASL*), involucrada en el desenvolupament neuronal, la neurotrimina (*NTM*), implicada en el creixement de neurites, o l'ARN llarg no codificant TCONS_00018147, que recolza el paper de la regulació de l'expressió gènica en el TDAH (Neale *et al.*, 2010b; Middeldorp *et al.*, 2016; Brevik *et al.*, 2016). Per últim, combinant en una metanàlisi les dades de dos GWAS basats en mesures quantitatives de la simptomatologia del TDAH en cohorts poblacionals, i aplicant una anàlisi basada en gens, es va detectar un potent efecte del gen que codifica per a un receptor acoblat a proteïna G amb activitat neuropeptídica (*GPR139*) en la simptomatologia de la inatenció (Ebejer *et al.*, 2013).

En línia amb aquest objectiu d'incrementar el poder estadístic dels estudis genètics realitzats en l'àmbit del TDAH i reportar resultats més robustos, s'han creat múltiples projectes de col·laboració que aposten per un abordatge multidisciplinar del trastorn, la millora de la caracterització clínica, i l'avenç cap a un diagnòstic objectiu i un tractament personalitzat. (Lange *et al.*, 2010; Matthews *et al.*, 2014; Thapar i Cooper, 2016). D'entre els projectes de col·laboració internacional més importants, es troba la Xarxa de Genètica Molecular del TDAH (*ADHD Molecular Genetics Network*; <http://adhdnet.com/wp/>), que conforma el Consorci de Genòmica del TDAH (*ADHD Genomics Consortium*) i que té com a objectiu estudiar la base genètica del trastorn. Aquest node, forma part del Consorci de Psiquiatria en Genòmica (PGC - *Psychiatric Genomics Consortium*; <http://www.med.unc.edu/pgc/>), que coordina grups d'investigació punters en meta-anàlisi de dades genòmiques de nou trastorns psiquiàtrics diferents i que ha publicat importants resultats que recolzen l'existència d'una base genètica comuna entre els diferents trastorns psiquiàtrics (Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium *et al.*, 2013a; Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2013b). Una altra de les organitzacions més rellevants és la Col·laboració Multi-Cèntrica Internacional del TDAH Persistent (IMpACT - *International Multi-centre persistent ADHD CollaboraTion*; <http://www.impactadhdgenomics.com>), un consorci que reuneix investigadors clínics i bàsics de set països europeus, Estats Units i Brasil, amb l'objectiu de realitzar i promoure una recerca de qualitat del TDAH al llarg de la vida. També cal destacar la Col·laboració Internacional sobre TDAH i Abús de Substàncies (ICASA - *International Collaboration on ADHD and Substance Abuse*; <http://www.adhdandsubstanceabuse.org/>), que cerca comprendre la relació entre el TDAH i els TUS, així com identificar la base genètica que protegeix o predisposa a desenvolupar addiccions en aquests individus. I finalment, cal esmentar també el consorci Multicèntric Internacional de Genètica del TDAH (IMAGE - *International Multicenter ADHD Genetics*), que cerca abordar l'estudi de diversos trets quantitius del TDAH (Kuntsi *et al.*, 2006).

2.1.2. Perfils d'expressió gènica

L'**expressió gènica** és el procés mitjançant el qual la informació codificada en la seqüència d'ADN d'un gen s'utilitza per sintetitzar un producte funcional. La regulació de l'expressió gènica constitueix el procés fonamental pel qual el **genotip** dona lloc a un tret observable o **fenotip**, i és crítica pel desenvolupament, l'homeòstasi i l'adaptació de l'organisme a l'ambient (Alberts *et al.*, 2002; Latchman DS, 2005). Els canvis en l'expressió gènica poden ser un reflex directe de la presència de mutacions en gens específics, o poden estar reflectint l'alteració de vies de senyalització o de factors reguladors com a resultat d'un estímul ambiental extern (Latchman DS, 2005; Emilsson *et al.*, 2008; Cookson *et al.*,

2009). Alguns dels canvis en l'expressió gènica són fàcilment reversibles i no tenen impacte a llarg termini, mentre que d'altres produeixen efectes de llarga durada i estables en el temps. Moltes d'aquestes diferències en l'expressió gènica apareixen durant el desenvolupament de l'organisme, però també poden aparèixer en organismes madurs, tant degut a l'atzar com sota influències ambientals, permetent a l'organisme adaptar-se al seu entorn (Jaenisch i Bird, 2003; Cedar i Bergman, 2009). Així, l'alteració de la regulació de l'expressió gènica condueix a l'aparició d'un fenotip determinat i, en última instància i en funció de la seva magnitud, el seu context i l'estat de la resta de processos, pot comportar el desenvolupament d'una malaltia o d'un trastorn (Latchman DS, 2005; Bonifer i Cockerill, 2011). La major part de les alteracions fisiopatològiques estan estretament lligades a canvis en el nivell d'expressió dels gens i, per aquesta raó, el seu estudi és determinant per a identificar els possibles mecanismes moleculars subjacents a una malaltia (Latchman DS, 2005).

En l'àmbit del TDAH, són relativament pocs els estudis que han avaluat els nivells d'expressió gènica amb l'objectiu d'identificar possibles biomarcadors i nous gens candidats que contribueixin a la millora de la caracterització dels subtipus clínics i a la definició de possibles **endofenotips**. L'abordatge de les alteracions de l'expressió gènica en el TDAH s'ha basat tant en estratègies d'anàlisi de gens candidats, com en l'avaluació dels perfils d'expressió a nivell genòmic mitjançant la tecnologia dels *microarrays*. La major part d'aquests estudis ha emprat models múrids de TDAH i, en molt pocs casos, s'han avaluat subjectes amb el trastorn. A més, els estudis que han considerat humans, han utilitzat mostres de teixits i fluids biològics perifèrics, i per tant, els perfils d'expressió gènica a nivell cerebral en subjectes amb TDAH encara es desconeix.

Els estudis realitzats fins al moment en individus amb TDAH, mitjançant un abordatge de gens candidats, han permès identificar una menor expressió gènica del receptor de dopamina DRD4 i de la proteïna d'unió a l'hormona alliberadora de corticotropina (CRHBP) en sang perifèrica d'infants i adults amb el trastorn, respectivament, així com un augment dels nivells de SNAP25, dels receptors de dopamina DRD4 i DRD5, del transportador de dopamina DAT1 i de l'enzim triptòfan-hidroxilasa 1 (TPH1) en subjectes adults amb el trastorn (Taurines *et al.*, 2011; Grünblatt *et al.*, 2012). Mitjançant la tècnica dels *microarrays*, també s'ha pogut detectar un augment dels nivells de prostaglandina-D2-sintasa (PTGDS) en sang perifèrica d'infants amb TDAH, així com alteracions en l'expressió de gens implicats en el sistema immune, l'activitat ribosomal, la cadena de transport d'electrons, la fosforil·lació oxidativa, l'adhesió cel·lular i el càncer, resultats que han permès definir patrons d'expressió específics per TDAH infantil o adult, i patrons d'expressió solapats amb altres trastorns psiquiàtrics, com ara la

trastorn depressiu major (Marín-Méndez *et al.*, 2012; de Jong *et al.*, 2016). Per altra banda, en una metanàlisi que va considerar 90 estudis amb dades sobre múltiples teixits, es va detectar un increment significatiu de noradrenalina i una disminució de 3-metoxi-4-hidroxifeniletilnglicol (MHPG), monoamina oxidasa (MAO) i feniletilamina en subjectes amb TDAH en comparació amb individus control (Scassellati *et al.*, 2012).

Pel que fa als estudis d'expressió mitjançant models múrids de TDAH, un dels més emprats ha estat el de **rata hipertensa espontània (SHR)**, considerat el més ben validat per a l'estudi d'aquest trastorn des d'un punt de vista conductual, genètic i neurobiològic (Sagvolden i Johansen, 2012). En l'estudi dels subtipus categòrics del TDAH, també s'ha emprat la soca *NCrl* de **rata Wistar Kyoto (WKY)**, un model de rata innatenta que mostra una base genètica i un substrat neurobiològic diferent a l'anterior (Sagvolden i Johansen, 2012). Per altra banda, altres estudis han optat pel **ratolí hiperactiu Coloboma**, que presenta una deleció de ~2cM que inclou els gens *Snap25*, *Pclb* i *Jag1*, i que expressa un nivell d'hiperactivitat deu vegades superior a l'habitual. Així, mitjançant l'estudi de gens candidats en aquests models animals, s'ha pogut detectar, per exemple, un augment de l'expressió del receptor de glucocorticoides *Nr3c1* i del factor de transcripció *Bhlhb2* en el CPF del model SHR, així com l'alteració dependent d'edat de l'expressió de l'intercanviador de *NA+/H+* (*NHE9*), codificat pel gen *Slc9a9* (*solute carrier, family 9, member 9*), en el cervell d'ambdós models de rata (Zhang-James *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2016). Altres estudis han reportat una menor expressió del receptor de dopamina 4 (*Drd4*), de galectina-3, de l'enzim glutamat descarboxilasa 2 (*Gad2*), del receptor d'acetilcolina nicotínic beta 4 (*Chrb4*), del co-transportador *NA+/colina* *Slc5a7* i de la proteïna associada al sinaptosoma 25 (*Snap25*) en CPF de SHRs, així com un increment dels nivells de *calcyon* en el circuit fronto-estriatal (Li *et al.*, 2007; Heijtz *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010; Santoro *et al.*, 2014). Mitjançant l'estudi del ratolí hiperactiu Coloboma, també s'ha reportat una disminució dels nivells de *Snap25* en el cervell (Raber *et al.*, 1997). Pel que fa als estudis que han avaluat els perfils d'expressió gènica mitjançant *microarrays* en aquests models animals, s'han reportat alteracions en l'expressió de gens implicats en la transcripció, el comportament, el neurodesenvolupament i la transmissió sinàptica, el sistema immune, la malaltia de Huntington i altres processos neurològics (Qiu *et al.*, 2010; Yoshida *et al.*, 2014; Watanabe *et al.*, 2015; dela Peña *et al.*, 2015). Altres estudis que han emprat un model de rata exposat a bifenils policlorinats (PCB), un component neurotòxic que pot produir l'aparició dels símptomes conductuals i dèficits neuropsicològics associats al TDAH, també han reportat canvis en l'expressió de gens implicats en processos dels trastorns neurològics, psicològics i neurodegeneratius, com ara la depressió sinàptica a llarg termini o el metabolisme del glutamat (Sazonova *et al.*, 2011).

2.1.3. Loci de trets quantitius d'expressió (eQTLs)

Tot i els avenços en la identificació de variants genètiques implicades en el risc a desenvolupar TDAH, el coneixement sobre el seu possible paper funcional en l'etiopatogènia del trastorn és força limitat. Algunes investigacions han identificat variants que modifiquen el risc a desenvolupar TDAH i que tenen un impacte sobre la **regulació de l'expressió gènica** (Hawi *et al.*, 2015). L'estudi de les diferències en els nivells d'abundància dels transcrits en funció de la dosi al·lèlica dels polimorfismes ha permès augmentar el coneixement sobre l'arquitectura genètica dels trets quantitius i establir una connexió entre les variants en la seqüència de l'ADN i la variació a nivell fenotípic (Lo *et al.*, 2003; Hoogendoorn *et al.*, 2003). Aquests *loci* genòmics que contribueixen a la variació dels nivells d'expressió gènica reben el nom de **eQTLs** o *loci* de trets quantitius d'expressió (eQTLs). Quan el *locus* influencia els nivells d'expressió d'un gen proper (sovint, <1 Mb), rep el nom de eQTL local o **cis-eQTL**, mentre que si es troba ubicat en una regió allunyada, o inclús, en un cromosoma diferent, s'anomena eQTL distant o **trans-eQTL**. Els eQTLs es poden localitzar en regions promotores, on poden impactar en els nivells d'expressió gènica a través d'efectes en el procés de transcripció, però també es poden ubicar en illes CpG, regions intròniques, interseccions exó-intró o regions 3' no codificants (UTR) on, a més de potencialment modular els nivells d'expressió, també poden influir en altres processos com ara els patrons de metilació, l'*splicing* o la regulació post-transcripcional de l'ARN missatger (ARNm) (Liu C, 2011; Gilad *et al.*, 2008). S'ha estimat que els elements que actuen com a *cis*-eQTL podrien explicar entre el 35 i el 54% de les diferències d'expressió gènica entre individus (Hoogendoorn *et al.*, 2003).

Diversos estudis han demostrat la importància d'aquest tipus de variants reguladores i del control de l'expressió gènica en l'etiologia dels trastorns psiquiàtrics (Richards *et al.*, 2012; Gamazon *et al.*, 2013). Per exemple, en una anàlisi de xarxes d'interacció proteica considerant gens candidats per TDAH, trastorns de l'espectre autista, esquizofrènia i discapacitat intel·lectual lligada al cromosoma X, es va detectar que els gens associats a aquestes condicions mostraven un enriquiment significatiu per a motius genòmics implicats en la unió de factors de regulació de l'expressió gènica (Cristino *et al.*, 2014).

2.2. Factors Ambientals

Les dades reportades fins al moment suggereixen que, a més de la contribució dels factors genètics, els factors ambientals també juguen un paper important en l'etiologia del TDAH i poden induir canvis en el seu fenotip. Es considera que la influència de l'ambient explicaria entre el 20 i el 30% de la seva labilitat.

Diversos estudis mostren que l'exposició a diversos factors com les **toxines ambientals**, la **dieta** o els **factors psicosocials**, s'associa al desenvolupament del TDAH, tot i que no de forma exclusiva, ja que molts d'aquests factors ambientals també estarien associats a un ampli espectre de trastorns psiquiàtrics i del neurodesenvolupament (Thapar *et al.*, 2012, Faraone *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2015).

Principalment, els factors ambientals que s'han trobat associats al TDAH durant les etapes pre i perinatales són el baix pes al néixer, la prematuritat, l'estrès matern i l'exposició intrauterina a nicotina, alcohol, fàrmacs i drogues il·legals, tot i que els resultats mostren certes inconsistències (Thapar *et al.*, 2012, Faraone *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2015; Linnert *et al.*, 2003; Mick *et al.*, 2002). Cal tenir present que l'existència d'associació no implica de forma indefectible causalitat, i que l'exposició a un factor de risc pot estar condicionada per factors confusors no mesurats, factors de selecció o per causalitat reversa -quan el fenotip influencia l'exposició ambiental-. En el cas de l'associació entre l'exposició prenatal a tabac i el desenvolupament de TDAH en els nomenats, tot i que s'ha identificat de forma consistent i dosi-depenent en diversos estudis, també s'ha destacat la dificultat per controlar de forma adequada els possibles factors confusors familiars i socials (Langley *et al.*, 2005; D'Onofrio *et al.*, 2008). Certs estudis evidencien que, donat que el consum de tabac pot impactar en processos fisiològics i generar un risc rellevant per al desenvolupament del TDAH, l'associació observada amb el trastorn podria resultar d'una correlació gen-ambient i representar l'efecte confusor de factors heretats i familiars (D'Onofrio *et al.*, 2008; Thapar *et al.*, 2009). Per altra banda, s'ha reportat que l'exposició a toxines ambientals, especialment, l'exposició intrauterina o durant la infància primerenca a plom, pesticides organofosforats o bifenils policlorats, constitueix un factor de risc per al trastorn, donat l'efecte deleteri d'aquests tòxics en els sistemes neurals i cognitius implicats en el TDAH (Thapar *et al.*, 2012, Faraone *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2015). Pel que fa a la dieta, diversos estudis han reportat l'associació entre el TDAH i certes deficiències nutricionals, com ara de zinc, magnesi o àcids grassos poliinsaturats, així com amb certs excessos, com el sucre o els colorants alimentaris artificials. Tanmateix, no s'ha pogut demostrar de forma concloent que aquests factors precedeixin el desenvolupament del trastorn i que es tracti de factors causals, de manera que se'ls considera més aviat factors correlacionats (Thapar *et al.*, 2012, Faraone *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2015). Finalment, tot i que l'exposició a un context de risc psicosocial, com una renda baixa, adversitat familiar o una infància difícil, ha demostrat una relació causal amb diversos trastorns psiquiàtrics, en el cas del TDAH també tendeix a considerar-se com a factor correlacionat, a excepció de la privació social severa durant la infància primerenca (Thapar *et al.*, 2012, Faraone *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2015; Graetz *et al.*, 2001; Larsson *et al.*, 2014b; Kreppner *et al.*, 2001; Rutter *et al.*, 2007).

2.3. Interacció gen-ambient: epigenètica

En la complexitat de l'etiologia dels trastorns complexos com el TDAH, els factors genètics poden aportar un risc indirecte addicional a través de la seva interrelació amb els factors ambientals. Les variants genètiques poden modificar la sensibilitat als factors ambientals de risc **-interacció gen-ambient-**, així com també poden influenciar la probabilitat d'exposar-se a un determinat context ambiental de risc **-correlació gen-ambient-** (State i Thapar, 2015; Harold *et al.*, 2013).

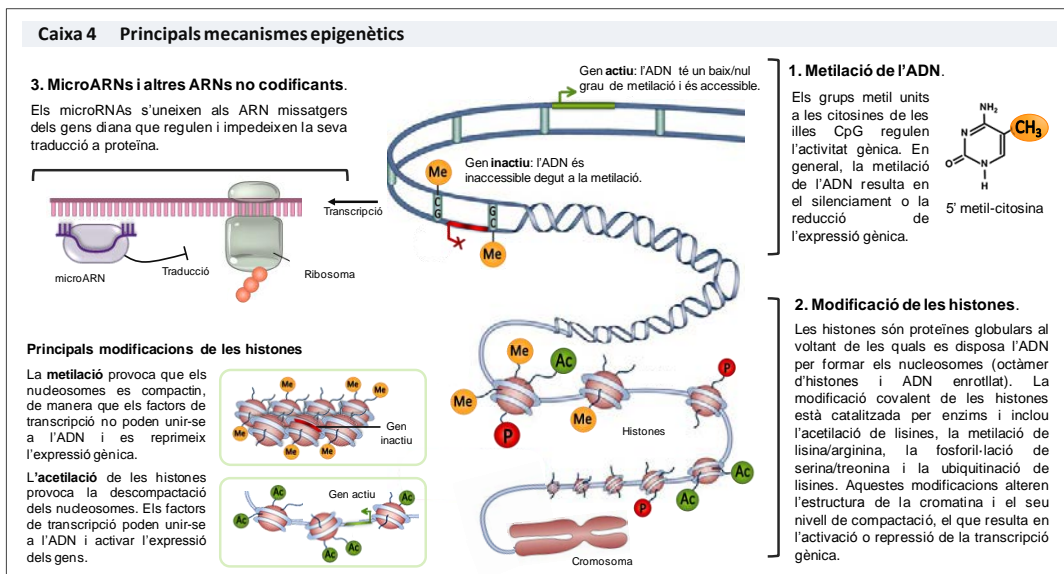
Tot i que es tracta d'un àmbit poc explorat en el TDAH, amb resultats poc contrastats i controvertits, diversos estudis han avaluat el paper de les interaccions gen-ambient en el trastorn. Per exemple, s'ha reportat la interacció entre variants genètiques en el transportador de dopamina *DAT1* i variables ambientals com el consum matern de tabac i/o alcohol durant l'embaràs, o l'adversitat psicosocial, tot i que els resultats han mostrat certes discrepàncies (Gizer *et al.*, 2009). En un estudi més recent, s'ha identificat l'efecte de la interacció entre l'estrès i una variant de la regió polimòrfica del promotor del transportador de serotonina *SLC6A4* (5-HTTLPR), en les dimensions d'hiperactivitat i impulsivitat del TDAH (van der Meer *et al.*, 2014). Altres investigacions han suggerit que variables ambientals com el consum matern de tabac i/o alcohol durant l'embaràs, l'adversitat durant la infantesa o la distància emocional paterna, podrien modular l'associació entre el trastorn i variants genètiques al gen de la monoamino oxidasa A (*MAOA*), els receptors de dopamina *DRD4* i *DRD2*, i el receptor colinèrgic nicotínic *CHRN4A* (Gizer *et al.*, 2009).

2.3.1. Metilació de l'ADN i modificació post-traducciona d'histones

Diversos estudis suggereixen que la complexa interrelació que s'estableix entre la susceptibilitat genètica i l'exposició a factors ambientals adversos en el desenvolupament de trastorns complexos com el TDAH estaria mediada per modificacions **epigenètiques** del genoma. Es defineix com a **epigenètica** l'estudi dels canvis heretables de la funció genòmica que no impliquen modificacions en la seqüència de l'ADN. A diferència dels canvis genètics, les modificacions epigenètiques són dinàmiques i sovint, reversibles, en funció de la presència o eliminació dels factors que les han induïdes. Per tant, hi haurà canvis fàcilment reversibles i sense impacte a llarg termini, mentre que d'altres produiran efectes de llarga durada i estables en el temps. Les modificacions epigenètiques estan estretament lligades a la influència dels factors ambientals i sovint sorgeixen en resposta a canvis de l'entorn, facilitant així l'adaptació d'una única cèl·lula o d'un organisme complet a un nou context. És a dir, actuen com un pont

molecular per mitjà del qual infinitat de factors ambientals, tant externs com interns, impacten i modelen la funció del genoma al llarg de tota la vida de l'organisme. L'estudi d'aquests mecanismes pot ajudar a elucidar les relacions existents entre la base genètica d'un individu, l'ambient, l'envelliment i les patologies (Liu *et al.*, 2008; Akbarian i Nestler, 2013; Schuebel *et al.*, 2016).

Existeixen diversos mecanismes epigenètics, incloent la **metil·lació de promotors** de la seqüència d'ADN, la **modificació post-traducciona de les histones** i **remodelació de la cromatina**, i la interacció entre aquests factors i altres molècules sensibles a l'ambient, com ara els **microARNs** i altres ARNs no codificants (Caixa 4). El principal esdeveniment cel·lular diana d'aquests mecanismes és la regulació de la transcripció gènica (Liu *et al.*, 2008; Akbarian i Nestler, 2013; Schuebel *et al.*, 2016).



Durant la darrera dècada, s'ha fet cada cop més evident que els processos epigenètics juguen un paper crucial en el neurodesenvolupament, i es creu que els efectes dels factors ambientals associats a fenotips conductuals estarien mediat per canvis epigenètics en regions cerebrals específiques. Per exemple, els patrons de metil·lació de l'ADN estan influenciats per factors ambientals com l'exposició intrauterina a nicotina, la qualitat de l'atenció materna durant els primers anys de vida o haver patit maltractaments durant la infantesa, els quals poden induir l'aparició de marques epigenètiques potencialment estables al llarg de la vida de l'individu (Schuch *et al.*, 2015).

Per altra banda, fins fa pocs anys, la recerca de factors genètics implicats en la etiologia dels trastorns complexos com el TDAH s'havia focalitzat en l'estudi de regions codificants per a proteïna. Tanmateix, dades recents indiquen que la major part de la variances fenotípica present als humans ve determinada per variants genètiques en elements reguladors implicats en el control de l'expressió gènica (Stranger *et al.*, 2007). Donat que encara es desconeixen factors genètics d'efecte major en el TDAH, i que els estudis genètics realitzats fins al moment han reportat resultats que expliquen una limitada part de la seva heretabilitat, existeix un creixent interès, no només pel rol dels factors epigenètics en el TDAH, sinó també per l'impacte de la variació genètica sobre aquests mecanismes.

Diversos estudis han aportat evidències que recolzen el paper dels mecanismes epigenètics com a mediadors de l'acció de l'ambient en el desenvolupament i evolució del TDAH. En aquest sentit, s'han identificat alteracions en els patrons d'acetilació de les histones en subjectes amb el trastorn, així com en els patrons de metilació de l'ADN de gens concrets, com ara aquells que codifiquen pel receptor de dopamina *DRD4*, el transportador de serotonina *SLC6A4* o el pèptid intestinal vasoactiu 2 (*VIPR2*) (Archer *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2015; Wilmot *et al.*, 2016). Adicionalment, també s'ha reportat un nivell inferior de metilació en diversos gens neuronals, associat a una major puntuació de la simptomatologia del TDAH (van Mil *et al.*, 2014). Per altra banda, també s'han realitzat anàlisis de metiloma a gran escala considerant TDAH infantil, on s'han identificat alteracions en components de vies de senyalització relacionades amb mecanismes inflamatoris, així com en regions genòmiques significativament associades al patró de desenvolupament del trastorn, on s'ubiquen gens relacionats amb el neurodesenvolupament i els processos peroxisomals (Wilmot *et al.*, 2015; Walton *et al.*, 2017).

2.3.2. Els microARNs

A més dels patrons de metilació de l'ADN i les modificacions de les histones, la regulació epigenètica mediada per ARNs no codificants, com els **microARNs**, ha suscitat interès en l'àmbit dels trastorns complexos i multifactorials com el TDAH.

El microARNs són molècules de RNA de cadena simple, de 21 a 30 nucleòtids, que exerceixen una important funció reguladora post-traducciona de l'expressió gènica, a través de la unió a l'ARNm dels gens diana i del control dels nivells de proteïna efectora. Els microARNs desenvolupen un rol crucial en la regulació de pràcticament tots els processos biològics coneguts i s'ha estimat que, en conjunt, regulen més dos terços del transcriptoma humà (Miller i Wahlestedt, 2010; Codocedo i

Inestrosa, 2016). Es caracteritzen per una funció reguladora pleiotròpica, en la què un únic microARN és capaç de modular l'expressió de múltiples gens diana, alhora que un mateix ARNm pot estar sota el control de diversos microARNs (Codocedo i Inestrosa, 2016). Com a conseqüència, l'alteració dels nivells o la funció d'aquestes molècules es pot traduir en importants canvis fenotípics associats a problemes en el desenvolupament i a l'aparició de patologies.

2.3.2.1. Biosíntesi

Els microARNs estan codificats per gens nuclears que es troben dispersos per tot el genoma, tot i que la gran majoria es troba organitzada en grups que es co-expressen en unitats transcripcionals policistròniques amb possibles vincles funcionals. Els gens dels microARNs poden estar ubicats dins de gens *hoste* o en regions intergèniques. Aproximadament, la meitat resideix en introns de gens *hoste* i al voltant d'un 10% ho fa en regions exòniques. En general, aquests gens intragènics es co-expressen amb els gens *hoste* sota el control del seu promotor, tot i que hi ha indicis que suggereixen que els microRNAs es podrien expressar de forma independent al seu gen *hoste*. Els microARNs intergènics, en canvi, es troben en regions molt distants de qualsevol seqüència codificant i constitueixen unitats transcripcionals independents que s'expressen sota el control dels seus propis promotors (Cai *et al.*, 2009; Godnic *et al.*, 2013; Ha i Kim, 2014; Cipolla GA, 2014).

La via canònica de biosíntesi dels microARNs s'inicia amb la seva transcripció al nucli, generant un transcrit **primari (pri-microARN)**, típicament d'una quilobase de longitud, que conté una estructura tija en bucle on hi està integrada la seqüència madura del microARN. A continuació, l'enzim **Drosha** del **complex microprocessador** l'escindeix en un **precursor** més curt (**pre-microARN**), d'uns 60-70 nucleòtids, que és exportat al citoplasma, on l'enzim **Dicer** talla el bucle generant una molècula intermediària d'uns 20-22 nucleòtids, anomenada **dúplex de microARN**. Aquest és incorporat al complex silenciador induït d'ARN (**RISC**), on les dues cadenes del microARN són separades. Una d'elles conformarà el **microARN madur**, mentre que la complementària serà, típicament, degradada -tot i que s'han reportat casos on les dues cadenes poden esdevenir microARNs funcionals-. Aquest complex multiproteic que inclou el microARN madur constitueix la unitat funcional de la regulació de l'expressió gènica mediada per microARNs i s'anomena **miRISC**. Mitjançant la complementarietat del microARN, el complex miRISC pot reconèixer els ARNm diana (Caixa 5 i Figura 14) (He i Hannon, 2004; O'Carroll i Schaefer, 2013; Ha i Kim, 2014; Codocedo i Inestrosa, 2016).

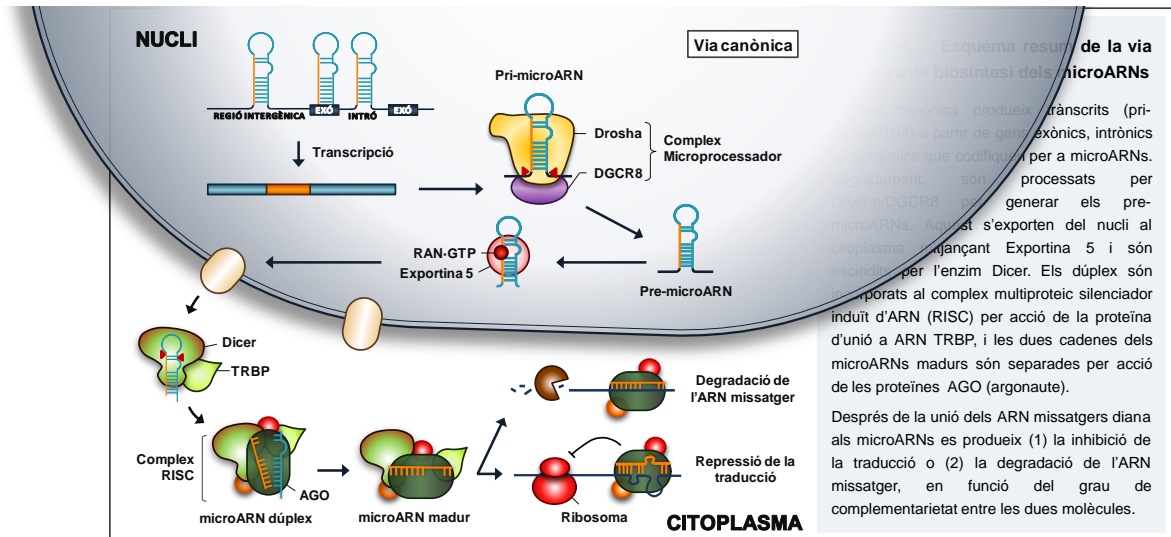
Caixa 5: Convencions en la nomenclatura dels gens dels microARNs

- La darrera versió de la base de dades de referència de microARNs, **miRBase**, ha catalogat 1.881 molècules precursors i 2.588 seqüències madures en l'humà.
- La numeració dels gens dels microARNs és seqüencial: **MIR121**, **MIR122**, etc. Cada vegada que s'identifica un de nou, rep la numeració consecutiva al darrer gen descrit, excepte quan existeix un vincle amb seqüències prèvies.
- S'utilitza la forma **mir-121** per designar tant el gen com l'estructura tija en bucle del pri-microARN, mentre que s'utilitza **miR-121** per fer referència a la forma madura.
- Les tres primeres lletres de la forma **hsa-mir-121** corresponen a l'organisme, en aquest cas *Homo sapiens*.
- Les seqüències precursors o *loci* genòmics que expressen seqüències madures idèntiques reben noms en la forma **hsa-mir-121-1** i **hsa-mir-121-2**.
- Per denotar seqüències madures estretament relacionades s'empren els sufixos alfabètics, com ara **hsa-miR-121a** i **hsa-miR-121b**, que provindrien dels precursors **hsa-mir-121a** i **hsa-mir-121b**, respectivament.
- Quan s'identifiquen dues seqüències de microARNs que s'originen a partir del mateix precursor:
 - Si les abundàncies relatives indiquen clarament quina és la forma predominantment expressada del microARN, les seqüències madures es designen de la forma **miR-56** (pel producte predominant) i **miR-56*** (del braç oposat del precursor).
 - Quan no hi ha suficients dades per determinar quina de les seqüències és la predominant, s'utilitzen els noms **miR-142-5p** (provinent del braç 5') i **miR-142-3p** (provinent del braç 3').
- Excepcions: Per raons històriques, alguns dels primers gens identificats en els estudis genètics conserven la nomenclatura que van rebre quan es van descobrir, com ara let-7 o lin-4. Les noves seqüències homòlogues a aquests microARNs també adquireixen aquests noms.

2.3.2.2. Mecanisme d'acció

Característicament, els microARNs exerceixen la seva funció reguladora a través de la unió a elements de la regió **3' UTR** dels ARNm dianes, tot i que existeixen evidències recents que demostren que també es podrien unir a elements ubicats a les regions 5' UTR i a les regions codificants (Cipolla GA, 2014). Les bases de les posicions consecutives 2-7 ó 2-8 de la regió 5' del microARN reben el nom de **seqüència llavor** i són les responsables de definir l'especificitat de la interacció. Aquesta regió està molt conservada i un petit canvi en la seva seqüència pot suposar l'alteració de l'espectre de les dianes del microARN. No obstant, tot i que la complementarietat amb la regió llavor és generalment suficient per a determinar una unió específica i permetre la correcta funció del microARN, també s'ha observat que el context adjacent tindria certa importància i podria condicionar l'especificitat i l'afinitat de la interacció. Així mateix, també s'ha suggerit que la formació d'una estructura bucle entre el microARN i l'ARNm i la seva localització, així com el context de la regió 3' UTR dels ARNm diana, podria afectar l'eficiència de la funció reguladora del microARN. En funció del grau de complementarietat entre les dues seqüències, la unió del microARN a l'ARNm diana pot resultar en la **desestabilització** i posterior **degradació** del transcrit, o en la seva **repressió traduccional**, sent aquest darrer mecanisme és el més habitual en humans (Figura 14) (Cai *et al.*, 2009; O'Carroll i Schaefer, 2013). Addicionalment, també s'han reportat accions no-canòniques dels microARNs, que inclouen l'activació de l'expressió gènica de forma directa

o a través de la guia de factors de transcripció als seus promotors, o la regulació dels transcrits primaris d'altres microARNs a nivell nuclear (Cipolla GA, 2014).



2.3.2.3. Regulació de la biosíntesi i funció dels microARNs

Donat que els microARNs estarien implicats en la regulació de pràcticament tots els processos biològics coneguts, i que modularien l'expressió de més de dos terços del transcriptoma humà, no és d'estranyar que la seva pròpia biogènesi i funció estiguin sota un estricte control temporal i espacial, i que la seva desregulació s'associï a l'aparició de múltiples patologies (Miller i Wahlestedt, 2010; Ha i Kim, 2014; Codocedo i Inestrosa, 2016). El control de la biogènesi dels microARNs inclou diversos nivells, com ara la regulació de la seva transcripció, el processament enzimàtic o modificacions del propi microARN, i inclús presenta circuits de regulació retrògrada, on per exemple, els microARNs regulen els factors de transcripció encarregats de la seva pròpia expressió (Ha i Kim, 2014; Davis i Hata, 2009). Així mateix, la presència de polimorfismes en els gens que codifiquen per als microARNs o altres proteïnes del sistema també té un impacte en la regulació d'aquest sistema. Per exemple, la presència de variants genètiques als promotors, a les regions de *splicing* del gen hoste en el cas de microARNs intrònics, o a la seqüència policistrònica en el cas de microARNs agrupats, pot alterar el seu nivell o patró de transcripció. Les variants genètiques ubicades al transcrit del microARN poden afectar el seu procés de maduració alterant l'afinitat per certes proteïnes implicades en el seu processament, mentre que si es troben a la seqüència del microARN madur, poden afectar l'especificitat de la interacció amb els ARNm i alterar el

seu espectre de dianes, creant noves seqüències llavor i/o eliminant-ne les canòniques (Jin i Lee, 2013; Ha i Kim, 2014; Cammaerts *et al.*, 2015).

Diversos estudis reporten l'associació entre diverses variants genètiques en components d'aquest sistema i el desenvolupament de múltiples malalties (Jin i Lee, 2013; Ha i Kim, 2014; Cammaerts *et al.*, 2015). S'ha demostrat que existiria una correlació negativa entre el número de SNPs que conté un gen de microARN i el número de malalties amb les que s'associa (Han i Zheng, 2013). És més, tenint present el funcionament pleiotròpic dels microARNs, i que es calcula que la major part de la variances fenotípica comuna seria deguda a la presència de variants en elements reguladors, l'estudi dels microARNs és presenta com a una estratègia prometedora sobretot en l'àmbit de les malalties complexes com el TDAH. El seu estudi podria donar resposta a part de la **base genètica comuna** compartida entre el TDAH i altres trastorns comòrbids, donat que l'alteració d'un únic microARN podria explicar un ampli ventall d'alteracions d'expressió gènica; i, alhora, podria esclarir part de l'**heterogeneïtat genètica** subjacent a aquestes condicions, ja que l'afectació de diferents microARNs podria convergir en l'alteració del mateix ARNm i per tant, el mateix canvi fenotípic podria tenir múltiples orígens genètics. Aquestes dades posen en rellevància el potencial dels microARNs no només com a biomarcadors, sinó també com a futures dianes terapèutiques, ja que actuar sobre aquest sistema ofereix la possibilitat de modular l'expressió de xarxes gèniques senceres dirigint l'acció terapèutica vers una única diana (Miller i Wahlestedt, 2010; Geaghan i Cairns, 2015; Issler i Chen, 2015; Sun i Shi, 2015; Issler i Chen, 2015). Per aquestes raons, l'estudi del seu paper en la susceptibilitat a desenvolupar TDAH ha estat un dels principals objectius d'aquesta Tesi Doctoral.

2.3.2.4. MicroARNs, trastorns psiquiàtrics i TDAH

Els microARNs en el cervell. La capacitat de regulació gènica dels microARNs i la seva diversitat és d'especial importància al cervell, on el nivell d'especialització de les neurones i el flux persistent d'informació requereix l'adaptació constant de les neurones als estímuls de l'ambient. Estudis mitjançant models animals que presenten dèficits en la biogènesi dels microARNs han revelat que aquest sistema juga un paper essencial en el neurodesenvolupament i la funció del SNC (Sun i Shi, 2015). S'ha determinat que al voltant del 50% de tots els microARNs identificats fins al moment s'expressen al cervell dels mamífers i estan distribuïts de forma específica i diferencial en les diferents àrees cerebrals. A més, a banda de l'especificitat regional, l'expressió dels microARNs també es diferencia en funció del tipus neuronal i presenta una **compartimentalització intra-neuronal**, i es dona de forma relativament

autònoma, en resposta a l'activació i/o la inhibició de l'**activitat sinàptica** i en coordinació amb la regulació de l'expressió gènica a nivell nuclear. Tenint present la complexitat del SNC, els microARNs constitueixen un mecanisme efectiu que assegura l'estricta control de l'expressió gènica neuronal que és necessari per a la regulació del desenvolupament, la funció i la supervivència de les neurones. Però sobretot, tenint en compte l'enriquiment de microARNs específics als compartiments dendrític i axonal, aquest sistema resulta crucial en el control local de l'expressió gènica implicada en la maduració i l'activitat sinàptiques (Miller i Wahlestedt, 2010; O'Carroll i Schaefer, 2013; Codocedo i Inestrosa, 2016).

L'especificitat de la localització sinàptica dels microARNs i la seva regulació dependent de l'activitat neuronal, vincula aquest sistema als processos fisiològics adaptatius de formació i funció dels circuits neurals en resposta als estímuls ambientals. A més, estudis recents reporten que l'expressió i la funció dels microARNs en el cervell també es veuen alterades en processos patològics en resposta a diversos factors ambientals com la llum, el so, les olors, els nutrients, l'estrès, els fàrmacs i/o les drogues, el que impacta en l'adaptació de l'organisme al seu entorn, així com en la seva conducta, l'emoció i la cognició, i pot conduir al desenvolupament de trastorns neuropsiquiàtrics (O'Carroll i Schaefer, 2013; Codocedo i Inestrosa, 2016).

Principalment, mitjançant l'ús de models animals, s'han identificat diversos microARNs específics de cervell o que hi estan enriquits. Entre els més importants, s'ha explorat extensament el paper del **miR-9** en la neurogènesi i la neurodiferenciació, o el rol del **miR-124** en la neurodiferenciació, la maduració neuronal, la transmissió sinàptica i la cognició. El **miR-137** també juga un paper crucial en la neurodiferenciació i en la neurogènesi de l'hipocamp en l'adult, i actua reduint la maduració neuronal. El **miR-219** promou la diferenciació dels oligodendròcits i està implicat en la diferenciació dels promotors neurals a la medulla espinal, on participaria en la regulació de la conducta associada al dolor. També s'ha identificat el **miR-132**, que juga un paper important en la plasticitat neuronal, l'activitat sinàptica i la memòria, així com en l'aprenentatge i la cognició (O'Carroll i Schaefer, 2013; Sun i Shi, 2015).

MicroARNs en trastorns psiquiàtrics. Múltiples evidències aportades a través d'estudis genètics i d'expressió en humans, models animals i sistemes cel·lulars, han demostrat la implicació de microARNs en la patologia psiquiàtrica. Tot i que els resultats són heterogenis i existeixen controvèrsies, s'han reportat alteracions en els nivells o patrons d'expressió dels microARNs en esquizofrènia, trastorn bipolar, trastorn depressiu major, o trastorns de l'espectre autista, entre d'altres, tant en sang perifèrica com a nivell cerebral -en mostres *post-mortem*- de subjectes amb aquests trastorns. Pel que fa als

abordatges genètics, s'han identificat nombroses variants de tipus SNP i CNV implicades en la regulació o la funció dels microARNs en relació a aquests trastorns. Mitjançant models animals, s'ha arribat a observar que la manipulació dels nivells cerebrals de certs microARNs pot alterar la seva conducta (Miller i Wahlestedt, 2010; Geaghan i Cairns, 2015; Sun i Shi, 2015; Issler i Chen, 2015). A la Taula 8 es descriuen els microARNs que s'han trobat associats a esquizofrènia, trastorn bipolar, trastorn depressiu major i trastorns de l'espectre autista, en més d'un estudi (Geaghan i Cairns, 2015).

MicroARNs i TDAH. Són pocs els estudis que han avaluat el paper dels microARNs en el TDAH o en fenotips associats, com la impulsivitat. Per una banda, s'ha identificat l'associació entre trets d'impulsivitat i variants genètiques de la regió 3' UTR del gen *SNAP25*, concretament, a les seqüències d'unió amb el **miR-641** (Németh *et al.*, 2013). A través d'estudis d'associació familiars i cas-control, així com en una metanàlisi, també s'han reportat evidències sobre l'associació d'aquestes variants i el TDAH, tot i que els resultats han estat inconsistents (Ye *et al.*, 2016). Per altra banda, també s'han identificat alteracions en els nivells d'expressió de diversos microARNs associades al TDAH. Mitjançant el model SHR, s'ha observat un increment dels nivells de **miR-let-7d** en el CPF d'aquests animals, concomitant a una reducció dels nivells de Galectina-3, una diana de regulació validada d'aquest microARN (Wu *et al.*, 2010). Recentment, aquests resultats han estat replicats tant en el model animal, com a nivell de microARNs circulants en sèrum de subjectes amb TDAH (Wu *et al.*, 2015). Un altre estudi basat en el model de ratolí de la soca BXD recombinant cosanguínia, va aportar dades preliminars sobre la implicació dels microARNs **miR-190b**, **miR-28a**, **miR-219a**, **miR-340** i **miR-491-5p** en la regulació de la plasticitat sinàptica observada en l'amígdala durant el desenvolupament, i possiblement, també en el manteniment del fenotip impulsiu (Pietrzykowski i Spijker, 2014). Finalment, un estudi més recent ha detectat una reducció dels nivells dels microARNs **miR-18a-5p**, **miR-22-3p**, **miR-24-3p**, **miR-106b-5p** i **miR-107**, així com un increment del **miR155a-5p** en sang de subjectes infantils i adolescents amb TDAH (Kandemir *et al.*, 2014).

Taula 8. MicroARNs associats a esquizofrènia, trastorn bipolar, trastorn per depressió major i trastorns de l'espectre autista, en més d'un estudi.

miRNA	Authors	miRNA	Authors
Schizophrenia		Major Depressive Disorder	
miR-106b ^α	Perkins <i>et al.</i> , 2007; Moreau <i>et al.</i> , 2011; Smalheiser <i>et al.</i> , 2014	miR-107 ^α	Smalheiser <i>et al.</i> , 2011; Belzeaux <i>et al.</i> , 2012
miR-107 ^α	Beveridge <i>et al.</i> , 2010; Santarelli <i>et al.</i> , 2011	miR-125a	Smalheiser <i>et al.</i> , 2011; Cao <i>et al.</i> , 2013
miR-132 ^α	Kim <i>et al.</i> , 2010; Miller <i>et al.</i> , 2012	miR-132 ^α	Smalheiser <i>et al.</i> , 2011; Li <i>et al.</i> , 2013
miR-132*	Kim <i>et al.</i> , 2010; Miller <i>et al.</i> , 2012	miR-142-3p	Smalheiser <i>et al.</i> , 2011; Smalheiser <i>et al.</i> , 2012
miR-134	Santarelli <i>et al.</i> , 2011; Gardiner <i>et al.</i> , 2012	miR-145 ^α	Smalheiser <i>et al.</i> , 2011; Belzeaux <i>et al.</i> , 2012
miR-137	Ripke <i>et al.</i> , 2011; Whalley <i>et al.</i> , 2012; Green <i>et al.</i> , 2013	miR-182	Smalheiser <i>et al.</i> , 2011; Li <i>et al.</i> , 2013; Cao <i>et al.</i> , 2013
miR-150	Santarelli <i>et al.</i> , 2011; Miller <i>et al.</i> , 2012	miR-200c	Smalheiser <i>et al.</i> , 2011; Belzeaux <i>et al.</i> , 2012
miR-15a ^α	Beveridge <i>et al.</i> , 2010; Moreau <i>et al.</i> , 2011	miR-298	Smalheiser <i>et al.</i> , 2011; Cao <i>et al.</i> , 2013
miR-16	Beveridge <i>et al.</i> , 2010; Smalheiser <i>et al.</i> , 2014	miR-376a*	Smalheiser <i>et al.</i> , 2011; Smalheiser <i>et al.</i> , 2012; Belzeaux <i>et al.</i> , 2012
miR-17 ^α	Santarelli <i>et al.</i> , 2011; Wong <i>et al.</i> , 2013; Smalheiser <i>et al.</i> , 2014	miR-381	Smalheiser <i>et al.</i> , 2011; Belzeaux <i>et al.</i> , 2012
miR-181b	Beveridge <i>et al.</i> , 2008; Beveridge <i>et al.</i> , 2010; Shi <i>et al.</i> , 2012	miR-494	Smalheiser <i>et al.</i> , 2012; Belzeaux <i>et al.</i> , 2012
miR-195 ^α	Perkins <i>et al.</i> , 2007; Beveridge <i>et al.</i> , 2010; Shi <i>et al.</i> , 2012	miR-497	Smalheiser <i>et al.</i> , 2011; Smalheiser <i>et al.</i> , 2012
miR-212	Perkins <i>et al.</i> , 2007; Kim <i>et al.</i> , 2010	Autism Spectrum Disorders	
miR-219-3p	Shi <i>et al.</i> , 2012; Smalheiser <i>et al.</i> , 2014	miR-106b ^α	Abu-Elneel <i>et al.</i> , 2008; Sarachana <i>et al.</i> , 2010
miR-24	Perkins <i>et al.</i> , 2007; Xu <i>et al.</i> , 2010	miR-1286	Vaishnavi <i>et al.</i> , 2013; Marrale <i>et al.</i> , 2014
miR-26b	Perkins <i>et al.</i> , 2007; Beveridge <i>et al.</i> , 2010	miR-1306	Vaishnavi <i>et al.</i> , 2013; Marrale <i>et al.</i> , 2014
miR-29c ^α	Perkins <i>et al.</i> , 2007; Beveridge <i>et al.</i> , 2010	miR-132 ^α	Abu-Elneel <i>et al.</i> , 2008; Talebizadeh <i>et al.</i> , 2008; Sarachana <i>et al.</i> , 2010
miR-30b	Perkins <i>et al.</i> , 2007; Mellios <i>et al.</i> , 2012	miR-146b	Abu-Elneel <i>et al.</i> , 2008; Talebizadeh <i>et al.</i> , 2008
miR-30e	Perkins <i>et al.</i> , 2007; Xu <i>et al.</i> , 2010	miR-148b ^α	Abu-Elneel <i>et al.</i> , 2008; Sarachana <i>et al.</i> , 2010
miR-320	Tabares-Seisdedos <i>et al.</i> , 2009; Miller <i>et al.</i> , 2012	miR-149	Vaishnavi <i>et al.</i> , 2013; Marrale <i>et al.</i> , 2014
miR-34a	Kim <i>et al.</i> , 2010; Lai <i>et al.</i> , 2011	miR-17 ^α	Kannu <i>et al.</i> , 2013; Hemmat <i>et al.</i> , 2014
miR-432	Lai <i>et al.</i> , 2011; Gardiner <i>et al.</i> , 2012	miR-185	Sarachana <i>et al.</i> , 2010; Vaishnavi <i>et al.</i> , 2013; Marrale <i>et al.</i> , 2014
miR-544	Kim <i>et al.</i> , 2010; Gardiner <i>et al.</i> , 2012	miR-18a	Kannu <i>et al.</i> , 2013; Hemmat <i>et al.</i> , 2014
miR-652	Lai <i>et al.</i> , 2011; Santarelli <i>et al.</i> , 2011	miR-195 ^α	Sarachana <i>et al.</i> , 2010; Vaishnavi <i>et al.</i> , 2013
miR-7	Perkins <i>et al.</i> , 2007; Beveridge <i>et al.</i> , 2010; Kim <i>et al.</i> , 2010	miR-199b-5p	Sarachana <i>et al.</i> , 2010; Ghahramani Seno <i>et al.</i> , 2011
Bipolar Disorder		miR-19a	Kannu <i>et al.</i> , 2013; Hemmat <i>et al.</i> , 2014
let-7b	Miller <i>et al.</i> , 2012; Shih <i>et al.</i> , 2012	miR-19b-1	Kannu <i>et al.</i> , 2013; Hemmat <i>et al.</i> , 2014
miR-106b ^α	Moreau <i>et al.</i> , 2011; Shih <i>et al.</i> , 2012; Smalheiser <i>et al.</i> , 2014	miR-200a	Vaishnavi <i>et al.</i> , 2013; Marrale <i>et al.</i> , 2014
miR-132 ^α	Miller <i>et al.</i> , 2012; Whalley <i>et al.</i> , 2012	miR-200b	Vaishnavi <i>et al.</i> , 2013; Marrale <i>et al.</i> , 2014
miR-133b	Kim <i>et al.</i> , 2010; Shih <i>et al.</i> , 2012	miR-20a	Kannu <i>et al.</i> , 2013; Hemmat <i>et al.</i> , 2014
miR-145 ^α	Kim <i>et al.</i> , 2010; Smalheiser <i>et al.</i> , 2014	miR-211	Miller <i>et al.</i> , 2009; Sarachana <i>et al.</i> , 2010; Vaishnavi <i>et al.</i> , 2013
miR-148b ^α	Moreau <i>et al.</i> , 2011; Shih <i>et al.</i> , 2012	miR-23a	Abu-Elneel <i>et al.</i> , 2008; Talebizadeh <i>et al.</i> , 2008; Sarachana <i>et al.</i> , 2010
miR-15a ^α	Moreau <i>et al.</i> , 2011; Shih <i>et al.</i> , 2012	miR-320a	Abu-Elneel <i>et al.</i> , 2008; Talebizadeh <i>et al.</i> , 2008
miR-17 ^α	Shih <i>et al.</i> , 2012; Smalheiser <i>et al.</i> , 2014	miR-429	Vaishnavi <i>et al.</i> , 2013; Marrale <i>et al.</i> , 2014
miR-27b	Moreau <i>et al.</i> , 2011; Shih <i>et al.</i> , 2012	miR-484	Abu-Elneel <i>et al.</i> , 2008; Vaishnavi <i>et al.</i> , 2013
miR-29a ^α	Kim <i>et al.</i> , 2010; Shih <i>et al.</i> , 2012	miR-598	Abu-Elneel <i>et al.</i> , 2008; Vaishnavi <i>et al.</i> , 2013
miR-29c	Shih <i>et al.</i> , 2012; Banigan <i>et al.</i> , 2013; Smalheiser <i>et al.</i> , 2014	miR-649	Vaishnavi <i>et al.</i> , 2013; Marrale <i>et al.</i> , 2014
miR-874	Kim <i>et al.</i> , 2010; Miller <i>et al.</i> , 2012	miR-650	Ghahramani Seno <i>et al.</i> , 2011; Marrale <i>et al.</i> , 2014
		miR-92a-1	Kannu <i>et al.</i> , 2013; Hemmat <i>et al.</i> , 2014
		miR-93	Abu-Elneel <i>et al.</i> , 2008; Sarachana <i>et al.</i> , 2010

^α El microARN s'ha identificat múltiples vegades en més d'una d'aquestes patologies.

Taula reproduïda de Geaghan i Cairns, 2015. Per a ampliar la informació o consultar les referències, veure l'article citat.

HIPÒTESIS I OBJECTIUS

L'objectiu principal del present treball de Tesi Doctoral és contribuir a l'expansió del coneixement de les bases etiològiques del TDAH, a través de la identificació de factors de risc genètics i biomarcadors, per tal d'avançar cap a un millor diagnòstic del trastorn i l'elaboració de pronòstics més fiables, l'optimització de les estratègies de prevenció i els abordatges terapèutics, i, en última instància, millorar qualitat de vida dels pacients i les seves famílies.

Hipòtesi 1

Donades les següents evidències:

- La complexa interrelació que s'estableix entre la susceptibilitat genètica i l'exposició a factors ambientals adversos en el desenvolupament de trastorns complexos com el TDAH està mediada per factors epigenètics sensibles a l'ambient com els microARNs.
- El sistema de regulació de l'expressió gènica mediada per microARNs juga un paper crucial en el desenvolupament i la funció del sistema nerviós central (SNC), i està implicat en la patologia psiquiàtrica, incloent el TDAH.
- Part de la varianza fenotípica observada en humans ve determinada per variants genètiques en elements reguladors de l'expressió gènica, com els microARNs.
- El 90% de les variants genètiques associades al TDAH no són codificants, sinó que estan ubicades en regions intergèniques o intròniques, sense una aparent importància funcional definida.
- Els microARNs es caracteritzen per una funció reguladora pleiotròpica, en la que un únic microARN és capaç de modular l'expressió de múltiples gens diana, alhora que un mateix ARNm pot estar sota el control de diversos microARNs.
- El TDAH presenta una elevada comorbiditat amb altres trastorns psiquiàtrics com els trastorns per ús de substàncies (TUS) o els trastorns disruptius de la conducta, el que contribueix a l'heterogeneïtat fenotípica i genètica del trastorn i dificulta la identificació dels factors genètics subjacents.

Es planteja la següent hipòtesi:

Variants genètiques comunes en els *loci* de microARNs i algunes de les seves dianes, amb evidències prèvies d'associació al TDAH o altres trastorns psiquiàtrics, participen en l'etiologia del TDAH a través de la regulació de l'expressió o la funció dels microARNs o les dianes genètiques que les contenen.

Objectius

1. Identificar factors de risc genètics implicats en la susceptibilitat a desenvolupar TDAH a través de l'anàlisi de polimorfismes ubicats en els *loci* de microARNs candidats i algunes de les seves dianes genètiques, mitjançant estudis d'associació cas-control poblacionals.
2. Diferenciar factors genètics de risc implicats en el desenvolupament de TUS o trastorns disruptius de la conducta comòrbids en el TDAH, mitjançant estudis d'associació cas-control poblacionals específics en aquestes poblacions.
3. Identificar alteracions en els nivells d'expressió dels microARNs associats a TDAH, mitjançant reacció en cadena de la polimerasa (PCR) quantitativa a temps real (RTqPCR) en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs).
4. Integrar, mitjançant anàlisis de trets quantitius d'expressió (eQTLs), les variants genètiques de risc associades a TDAH amb la desregulació dels microARNs que les contenen (*cis*), així com amb altres gens a nivell transcripcional (*trans*).
5. Explorar les principals funcions i vies de senyalització cel·lular en les que estan implicats els gens identificats en les anàlisis de eQTLs.

Hipòtesi 2

Donades les següents evidències:

- El TDAH té una heretabilitat estimada del 70-80%, on l'efecte dels polimorfismes de nucleòtid únic (SNPs) comuns n'explicaria el 28%.
- L'abordatge genètic del TDAH a través d'estudis de lligament i d'estudis d'associació basats en gens candidats ha mostrat limitacions i els resultats reportats no sempre han estat consistents.
- El TDAH persistent en l'edat adulta presenta una menor heterogeneïtat fenotípica i genètica en comparació amb mostres d'infants amb TDAH, ja que les darreres inclouen subjectes que presenten les formes remissiva i persistent del trastorn.
- Els avenços en les tecnologies de genotipació permeten avaluar de forma massiva i rutinària un elevadíssim número de variants genètiques, en mostres prou grans com per a poder detectar efectes genètics lleus i moderats.
- La disponibilitat d'informació detallada sobre l'arquitectura genètica de milers d'individus de múltiples poblacions permet seleccionar col·leccions de SNPs en base als patrons de desequilibri de lligament (LD), maximitzant la cobertura genètica i assegurant la captura de la major part de la variabilitat genètica d'una regió genòmica sense pèrdua d'informació, i evitant recollir informació redundant.
- En els estudis d'associació a escala genòmica (GWAS), s'avaluen de forma sistemàtica milions de SNPs al llarg de tot el genoma, sense una hipòtesi precedent, el que permet identificar nous gens, donat que no depèn del coneixement previ disponible.
- Els dissenys GWAS basats en gens permeten reduir el número de tests realitzats i detectar *loci* amb múltiples variants de significació llinar que no emergirien mitjançant l'abordatge basat en SNPs.
- Els estudis d'enriquiment funcional i de vies de senyalització cel·lular aporten informació sobre la implicació de funcions cel·lulars concretes i vies biològiques específiques en l'etiologia d'un trastorn.

Es planteja la següent hipòtesi:

L'anàlisi massiu a escala genòmica de variants genètiques comunes mitjançant GWAS basats en SNPs, complementat amb estratègies basades en gens i estudis d'enriquiment funcional i vies de senyalització, permet la identificació de nous gens i regions implicades en el trastorn, i l'establiment dels possibles mecanismes fisiopatològics subjacents a la seva etiologia.

Objectius

6. Identificar factors de risc genètics implicats en la susceptibilitat a desenvolupar TDAH en l'edat adulta, a través de la realització d'estudis GWAS basats en SNPs i en gens, i replicar els resultats considerant tres mostres europees independents i dades metanalítiques de GWAS en TDAH, obtingudes en el marc del Consorci de Genòmica en Psiquiatria (PGC).
7. Explorar el possible rol funcional de les variants identificades en l'estudi GWAS basat en SNPs mitjançant anàlisis de eQTLs en línies cel·lulars limfoblastoides i l'avaluació dels efectes sobre l'estructura cerebral en una mostra d'adults sans.
8. Avaluar els nivells d'expressió dels gens identificats en l'estudi GWAS basat en gens en PBMCs mitjançant la tecnologia dels *microarrays* i la validació dels resultats amb RTqPCR.
9. Explorar les principals funcions i vies de senyalització cel·lular en les que estan implicats els gens identificats en els estudis GWAS.

RESULTATS

Els resultats d'aquesta Tesi Doctoral, dividits en dues seccions, queden reflectits en el contingut dels manuscrits que es descriuen a continuació.

1. SECCIÓ 1

Impacte de la variació genètica en elements reguladors de l'expressió gènica: Estudis d'associació cas-control basats en microARNs i gens candidats pel TDAH

1.1. Article 1 (Annex 1)

Sánchez-Mora C, Ramos-Quiroga JA, Garcia-Martínez I, Fernández-Castillo N, Bosch R, Richarte V, Palomar G, Nogueira M, Corrales M, Daigre C, Martínez-Luna N, Grau-Lopez L, Toma C, Cormand B, Roncero C, Casas M, Ribasés M. **Evaluation of single nucleotide polymorphisms in the miR-183-96-182 cluster in adulthood attention-deficit and hyperactivity disorder (ADHD) and substance use disorders (SUDs).** *European Neuropsychopharmacology*. 2013 Nov; **23(11)**: 1463-73.

Resum

Diverses evidències aportades per estudis genètics i estudis amb models animals recolzen la implicació del receptor de serotonina 1B (*HTR1B*) en el TDAH, i suggereixen que la variació genètica comuna en microARNs o en les seves dianes podria alterar la regulació de l'expressió gènica i conferir risc a desenvolupar TDAH. En el present estudi s'ha avaluat la contribució al trastorn de polimorfismes al *locus* del grup miR-183-96-182 i del gen *HTR1B*, la diana de regulació del miR-96, mitjançant estudis d'associació cas-control poblacionals, en una mostra de 695 adults amb TDAH (266 subjectes amb trastorn per ús de substàncies (TUS) comòrbid i 396 sense TUS), 403 subjectes amb TUS sense diagnòstic de TDAH al llarg de la vida, i 485 controls emparellats per sexe i d'origen espanyol. Les anàlisis de marcador únic i marcadors múltiples han revelat l'associació entre les variants rs2402959 i rs6965643, ubicades a la regió 3' del miR-96, i TDAH sense TUS comòrbid, així com entre la variant rs6965643 i TDAH sense TUS ni trastorns disruptius de la conducta.

Aquests resultats aporten evidències preliminars sobre la contribució de variants en la seqüència del grup miR-183-96-182 en el TDAH sense TUS comòrbid, i sense TUS ni trastorns disruptius de la conducta, i emfasitzen la necessitat de tenir en compte les comorbiditats en els estudis genètics per tal de minimitzar l'efecte de l'heterogeneïtat, així com de clarificar la base genètica d'aquests fenotips complexos.

El contingut referent a aquest manuscrit es troba a l'Annex 1.

1.2. Article 2

Garcia-Martínez J, Sánchez-Mora C, Pagerols M, Richarte V, Corrales M, Fadeuilhe C, Cormand B, Casas M, Ramos-Quiroga JA, Ribasés M. **Preliminary evidence for association of genetic variants in pri-miR-34b/c and abnormal miR-34c expression with attention deficit and hyperactivity disorder.** *Translational Psychiatry*. 2016 Aug 30; **6(8)**: e879.

Resum

Sota la hipòtesi que alteracions en el processament o la funció dels microARNs podria conferir risc a desenvolupar TDAH, s'ha explorat el paper de la variació genètica comuna en múltiples microARNs i algunes de les seves dianes gèniques validades, seleccionant aquells que, o bé ells o les seves dianes, havien estat associats prèviament a TDAH o altres trastorns psiquiàtrics. Mitjançant un estudi d'associació cas-control exhaustiu centrat en 134 microARNs, considerant una mostra de 754 subjectes amb TDAH i 766 controls, s'ha identificat l'associació entre el *locus* del grup miR-34b/c i el TDAH, i s'han aportat evidències preliminars sobre la sobre-expressió del microARN madur miR-34c-3p en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs) de subjectes amb el trastorn en comparació amb controls sans. Addicionalment, s'ha detectat que el polimorfisme rs4938923 -al promotor del transcrit primari del mir-34b/c- es comportava com a *loci* de tret quantitatiu d'expressió en *cis* (local) pels microARNs miR-34b i miR-34c, així com per a 681 transcrits en *trans* (distant), entre els quals s'inclouen diversos gens prèviament associats a TDAH. Els estudis d'enriquiment funcional i de vies de senyalització considerant aquest conjunt de transcrits han revelat sobre-representació de dianes dels miR-34b/c, així com de categories funcionals relacionades amb el sistema nerviós central -com la guia d'axons o la diferenciació neuronal-, i de les vies de senyalització canòniques de biosíntesi de la serotonina i la senyalització del seu receptor.

Aquests resultats aporten evidències preliminars sobre la contribució de variants funcionals al promotor del pri-mir-34b/c a la susceptibilitat a desenvolupar TDAH, possiblement a través de la desregulació de l'expressió dels miR-34b i miR-34c, i d'algunes de les seves dianes. Aquestes dades ressalten la importància de l'alteració de mecanismes de regulació de l'expressió gènica -com els microARNs- en el TDAH.

ORIGINAL ARTICLE

Preliminary evidence for association of genetic variants in pri-miR-34b/c and abnormal miR-34c expression with attention deficit and hyperactivity disorder

I Garcia-Martínez^{1,2}, C Sánchez-Mora^{1,2,3}, M Payerols^{1,2}, V Richarte^{2,3,4}, M Corrales^{1,2,4}, C Fadeuilhe², B Cormand^{5,6,7,8}, M Casas^{1,2,3,4}, JA Ramos-Quiroga^{1,2,3,4} and M Ribasés^{1,2,3}

Attention deficit and hyperactivity disorder (ADHD) is a prevalent neurodevelopmental disorder characterized by impairment to sustain attention and inability to control impulses and activity level. The etiology of ADHD is complex, with an estimated heritability of 70–80%. Under the hypothesis that alterations in the processing or target binding of microRNAs (miRNAs) may result in functional alterations predisposing to ADHD, we explored whether common polymorphisms potentially affecting miRNA-mediated regulation are involved in this psychiatric disorder. We performed a comprehensive association study focused on 134 miRNAs in 754 ADHD subjects and 766 controls and found association between the miR-34b/c locus and ADHD. Subsequently, we provided preliminary evidence for overexpression of the miR-34c-3p mature form in peripheral blood mononuclear cells of ADHD subjects. Next, we tested the effect on gene expression of single-nucleotide polymorphisms within the ADHD-associated region and found that rs4938923 in the promoter of the pri-miR-34b/c tags *cis* expression quantitative trait loci for both miR-34b and miR-34c and has an impact on the expression levels of 681 transcripts in *trans*, including genes previously associated with ADHD. This gene set was enriched for miR-34b/c binding sites, functional categories related to the central nervous system, such as axon guidance or neuron differentiation, and serotonin biosynthesis and signaling canonical pathways. Our results provide preliminary evidence for the contribution to ADHD of a functional variant in the pri-miR-34b/c promoter, possibly through dysregulation of the expression of mature forms of miR-34b and miR-34c and some target genes. These data highlight the importance of abnormal miRNA function as a potential epigenetic mechanism contributing to ADHD.

Translational Psychiatry (2016) 6, e879; doi:10.1038/tp.2016.151; published online 30 August 2016

INTRODUCTION

Attention deficit and hyperactivity disorder (ADHD) is a highly prevalent neuropsychiatric disorder characterized by severe impairment to sustain attention, inability to control impulses and difficulties to modulate activity levels. Epidemiological studies report a worldwide ADHD prevalence of 5–12% for children and 3–8% for adults.¹ The etiology of ADHD is complex, with both genetic and environmental factors having key roles.² Twin, family and adoption studies suggest a major component of genetic risk factors, pointing to an estimated heritability around 70–80%.³ The Psychiatric Genomics Consortium has recently shown direct, empirical and quantified molecular evidence for a significant genetic contribution to ADHD and estimated a single-nucleotide polymorphism (SNP)-based heritability of 0.28, which is distant to the total ADHD heritability and highlights the need for additional studies to unravel the ADHD genetic background.⁴

Although association, linkage and animal model strategies have been followed to uncover the genetic background of ADHD, consistent genetic risk factors with a major role in its susceptibility have not yet been discovered.⁵ Pathogenic models of ADHD have traditionally focused on the dysregulation of the dopaminergic,

serotonergic and noradrenergic neurotransmission systems, the regulation of neurotransmitter release (SNARE complex) and on neurotrophic factors.⁶ In addition to candidate-gene association studies, genome-wide association studies (GWAS) have also been carried out in nine independent data sets in ADHD, seven of which focused on childhood samples and two on adults.^{3,5,7,8} However, none of them reported genome-wide significant findings or highlighted previous candidate genes for ADHD or identified associations overlapping with those of other GWAS.

Research on ADHD has traditionally focused on protein-coding sequences, but some data suggest that most of the common phenotypic variation would stem from variants in regulatory elements rather than in protein-coding sequences.⁹ Thus, there is a growing interest into genetic variation affecting epigenetic mechanisms involved in the dysregulation of gene expression. Among them, microRNAs (miRNAs) have emerged as strong candidates. These small non-coding single-stranded RNA molecules have important gene-regulatory roles by pairing to the messenger RNA (mRNAs) of protein-coding genes to direct their posttranscriptional repression.¹⁰ Some observations, however, suggest that miRNAs can also target other genomic regions, such

¹Psychiatric Genetics Unit, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ²Department of Psychiatry, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; ³Biomedical Network Research Centre on Mental Health (CIBERSAM), Madrid, Spain; ⁴Department of Psychiatry and Legal Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ⁵Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; ⁶Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, Madrid, Spain; ⁷Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain and ⁸Institut de Recerca Pediàtrica, Hospital Sant Joan de Déu, Esplugues, Barcelona, Spain. Correspondence: Dr M Ribasés, Psychiatric Genetics Unit, Vall d'Hebron Research Institute, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain.

E-mail: marta.ribases@vhir.org

Received 2 December 2015; revised 16 June 2016; accepted 19 June 2016

as 5'-UTR elements, promoters or coding sequences, and additionally they may even be able to stimulate gene expression. The miRNAs configure a complex network where individually they may regulate hundreds of genes and collectively they are predicted to modulate from 30 to 80% of the human genome.¹¹ Thus, slight variations affecting this system may lead to altered miRNA function, have pleiotropic effects, and contribute to part of the genetic heterogeneity underlying complex diseases. Interestingly, around 70% of all known miRNAs are expressed in the brain and have key roles in cell-fate specification and survival, neurite projection and synaptic plasticity.¹² Moreover, miRNAs are known to be implicated in psychiatric and neurological disorders. A GWAS in schizophrenia revealed that the strongest association corresponded to miR-137, and SNPs in multiple other miRNAs, such as miR-206, miR-198, miR-24 or miR-30e, have also been associated with this disorder.^{13,14} Abnormal miRNA biogenesis and expression levels have been observed in schizophrenia, bipolar or autism spectrum disorder (ASD). Moreover, variants within the miR-183-96-182 cluster locus or in the miR-641 binding sites at *SNAP25* gene have been associated with ADHD and impulsivity, respectively.^{15,16} In addition, a recent study reported altered circulating levels of miRNAs in ADHD subjects and suggested that miR-107 levels below a certain threshold were highly predictive and specific for ADHD.¹⁷

Considering this background altogether, we attempted to unravel novel susceptibility factors for ADHD by conducting a case-control association study focused on miRNAs and their target genes. We selected miRNAs based on the previous association of their validated targets to psychiatric illness, giving priority to those linked to ADHD. Subsequently, we conducted a case-control association study in 754 adult ADHD subjects and 766 healthy controls. The impact of the associated variants on gene expression was evaluated through analysis of Quantitative Trait Loci (eQTLs) in *cis* and *trans* in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from subjects with ADHD. Top hits from the *trans*-eQTL results were considered for functional and canonical pathway overrepresentation and gene-network construction.

MATERIALS AND METHODS

Case-control association study

Subjects. The clinical sample consisted of 754 Caucasoid Spanish adults with ADHD (61% combined, 36% inattentive and 3% hyperactive/impulsive). Sixty-seven percent of the individuals were male and the average age at assessment was 33 years (s.d. = 12.7). The evaluation of the ADHD diagnosis was carried out with the Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I and II Disorders (SCID-I and SCID-II) and with the Conners' Adult ADHD Diagnostic Interview for DSM-IV (CAADID parts I and II).¹⁸ The severity of ADHD symptoms was assessed with the long version of the Conners' ADHD Rating Scale (self-report [CAARS-S:L] and observer [CAARS-O:L]),¹⁹ the ADHD rating scale,²⁰ the ADHD screening checklist²¹ and the Wender Utah Rating Scale for retrospective symptomatology.²² The level of impairment was measured with the Clinical Global Impression and the Sheehan Disability Inventory.^{23,24} Additional tests used for clinical assessment are available in Ribasés et al.²⁵ The control sample included 766 unrelated Caucasoid Spanish healthy individuals matched for sex with the clinical group. Sixty-seven percent of the subjects were male with an average age of 57 years (s.d. = 18.4). ADHD symptomatology was excluded retrospectively under the following criteria: (1) not having been diagnosed with ADHD previously and (2) answering negatively to the life-time presence of the following ADHD symptoms: (a) often has trouble in keeping attention on tasks; (b) usually loses things needed for tasks; (c) often fidgets with hands or feet or squirms in seat and (d) often gets up from seat when remaining in seat is expected. All the subjects were evaluated and recruited at the Hospital Universitari Vall d'Hebron of Barcelona (Spain) and diagnosis was blind to genotype. The study was approved by the ethics committee of our institution and written informed consent was obtained from all the subjects before the inclusion into the study.

DNA isolation, SNP selection and genotyping. Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes by the salting-out procedure.

MiRNA and miRNA clusters: On the basis of literature data, 134 miRNAs distributed in 53 loci with at least one confirmed target gene involved in ADHD or other psychiatric disorders, including schizophrenia, bipolar disorder, major depression and/or ASD, were selected from a total of 5201 records of experimentally validated miRNA-target interactions available at the miRecords database (release 2012).²⁶ MiRNA clusters were defined as genomic regions containing at least two contiguous miRNAs with an interdistance of < 10 kb. Candidate regions spanned 5 kb upstream and 3 kb downstream from each miRNA or from the first and last miRNA of each cluster. When miRNAs were located in a transcriptional unit, some additional 5 kb upstream from the host gene were also included.

MiRNA targets: The analysis of 3'-UTR regions was restricted to target genes of those miRNAs displaying association with ADHD in the case-control association study. Experimentally validated miRNA targets were selected using information available in different databases, including TargetScan (release 6.2), Diana-TarBase (version 7.2), miRTarBase (release 2014, version 6.0), miRBase (release 21) and miRecords (release 2012), or through literature searches (Supplementary Table 1).²⁶⁻²⁹ Considering only those mRNAs that are targeted by the miRNA found to be associated with ADHD in this study, a total of 12 candidate genes were initially selected on the basis of experimental data supporting each miRNA-mRNA interaction (*BCL2*, *CREB1*, *CRHR1*, *HMG2*, *JAG1*, *MET*, *MYC*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *NOTCH4* and *VEGFA*; Supplementary Table 1).

Tagged-SNP selection was based on genetic coverage criteria ($r^2 \leq 0.85$) considering SNPs with a minor allele frequency (MAF) ≥ 0.10 from the CEPH population provided by the HapMap Project Database (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>; release 28) and using the *LDSelect* Software (<http://bioapp.psych.uic.edu/HapMap-LDSelect-Processor.html>, University of Washington, Seattle, WA, USA). Under these conditions, we selected 214 tagSNPs covering, in terms of linkage disequilibrium (LD), genomic regions containing 134 miRNAs. We also selected 20 SNPs that tag the 3'-UTR regions of genes encoding mRNAs that are targeted by the miRNA found to be associated with ADHD in this study. From the 12 target genes initially selected, no SNPs at *NOTCH4* or *MYC* fulfilled the aforementioned criteria and, therefore, only 10 candidate genes were finally considered (*BCL2*, *CREB1*, *CRHR1*, *HMG2*, *JAG1*, *MET*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3* and *VEGFA*). An additional variant, rs4525537, reported in the 1000 Genomes database (<http://browser.1000genomes.org/>; release 14), was also included owing to its close location to the miR-34c target site in the *CRHR1* 3'-UTR (14 nucleotides upstream from the miRNA-mRNA binding site). From the 235 SNPs that were initially selected, a proper design was not achieved for four of them, and in some additional 10, the genotyping assay failed (genotyping rate of 97.5% for the miRNAs assay and 100% for the target genes assay). All SNPs were genotyped using the PCR-based KASP platform (Progenika Biopharma, A GRIFOLS Company, Bizkaia, Spain).

Statistical analysis

The minimal statistical power of the sample was estimated *post hoc* using the Power Calculator for Two Stage Association Studies software (CaTS, <http://csg.sph.umich.edu/abecasis/CaTS/index.html>), assuming an odds ratio (OR) of 1.2, a disease prevalence of 0.05, a significance level (α) of 0.05, the lowest MAF observed in our control sample (0.10), and an additive model of inheritance. Potential genetic stratification in our sample was previously discarded.³⁰

Single-marker analyses. The analysis of Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) in the control sample ($P_{\text{HWE}} < 0.01$) and the comparison of genotype frequencies between cases and control subjects under a log-additive model of inheritance were performed using the SNPpass R Library.³¹ Dominant (11+12 vs 22) and recessive (11 vs 12+22) models of inheritance were only considered for those SNPs displaying nominal association under a log-additive model. Genotype frequencies of SNPs located in chromosome X were only studied in females. All the tests were adjusted by gender. To measure and control the proportion of false positives incurred in the study, we used the false discovery rate (FDR) method, an approach to adjust for multiple comparisons that provides a good balance between discovery of statistically significant findings and controlling type I errors (α). The q -value was computed using the *qvalue* R package³² considering all the association tests performed for miRNAs and target genes jointly. We considered all the P -values from each SNP tested under an additive model of inheritance, as well as the P -values from the dominant and recessive

models when considered (when the association under the additive model was significant ($P < 0.05$)). Under these conditions, a total of 232 P -values were included and a unique FDR of 20% that corresponded to $P < 1.58e - 03$ was considered.

Gene-based analysis. Gene-based association analysis was performed using the Versatile Gene-based Association Study (VEGAS) 2 software (<https://vegas2.qimrberghofer.edu.au/>).³³ We considered all genomic regions containing miRNA or target genes with more than one genotyped SNP per region. All the genotyped SNPs available from each locus were included in the analysis considering the nominal P -value of each association test from the single-marker analysis. Regions were defined spanning 10 kb upstream and downstream from each locus, and European samples from 1000 Genomes were used to assess their LD structure.

Analysis of additive and epistatic effects. To evaluate the potential additive and epistatic effects between the identified risk variants, a stepwise logistic regression procedure was implemented using the SPSS 17.0 Statistical Package (SPSS, Chicago, IL, USA), considering the overall, the combined or the inattentive samples as dependent variables and the ADHD-risk variants as independent variables. The hyperactive-impulsive sample was not considered, owing to its limited sample size.

Gene expression assays

RNA isolation. Total RNA was extracted from PBMCs of a medication-naive subset of 45 ADHD individuals from the sample included in the case-control association study (68% were male and mean age was 38 years (s.d.=9.9)) and from 32 additional control subjects (69% were male and mean age was 37 years (s.d.=12.1)) using the Ficol density gradient method and the RNeasy Midi kit (Qiagen, Hilden, Germany). RNA and miRNA quality assessment was assayed by 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Expression analysis of miR-34b and miR-34c by quantitative real-time reverse transcription in ADHD subjects and controls. In 31 out of the 45 cases mentioned above, the total RNA isolation protocol from PBMCs was performed with further enrichment of miRNAs. Considering only the miRNA found significantly associated with ADHD in this study, the expression levels of the mature forms miR-34b-3p, miR-34b-5p, miR-34c-3p and miR-34c-5p were assessed in these 31 cases and in 32 additional control subjects by reverse transcription reaction using the Taqman MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA). Quantitative real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) for each assay was run in triplicate using Taqman MicroRNA Assays (Applied Biosystems) and measured in Applied Biosystems 7900HT fast real-time PCR system. The threshold cycle (C_T) was defined as the fractional cycle number at which the fluorescence exceeded the threshold of 0.2. The relative quantification of miRNA expression was calculated by the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method,³⁴ considering U6 as endogenous control gene after checking its stability and linearity across all the samples. Batch, gender and age were considered as covariates when a significant association with the study outcome was observed ($P > 0.20$) and were kept in the statistical model if the corresponding equation parameter was significant in the fitted model ($P < 0.05$). Logistic regression models were applied to compare expression differences between ADHD cases and controls. All the statistical tests were two-sided and the significance threshold was set at $P < 0.05$.

Cis-eQTLs in ADHD subjects by qRT-PCR. The cis-eQTL analyses were assessed in the subset of 31 ADHD subjects from which genotype data for rs4938723 and rs28690953 and expression levels of miR-34b-3p, miR-34b-5p, miR-34c-3p and miR-34c-5p were available. Linear regression models were used for eQTL mapping with the SPSS 17.0 Statistical Package (SPSS). All the statistical tests were two-sided and the significance threshold was set at $P < 0.05$.

Trans-eQTLs in ADHD subjects by microarray assay. Genome-wide gene expression data from microarray assays was used for the trans-eQTL analyses in 45 ADHD subjects (60% overlap with the ADHD sample included in the qRT-PCR assays). RNA was reverse transcribed using the Ambion WT Expression Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The cRNA was subsequently fragmented, labeled and hybridized with the GeneChip WT Terminal Labeling and Hybridization Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). The samples were hybridized to the Genechip Human Gene 1.1 ST 96-Array plate (Affymetrix), covering a total of 36 079

transcripts that correspond to 21 014 genes. The array processing and data generation were assessed using the Gene Titan Affymetrix microarray platform. The raw data were pre-processed with the Robust Multichip Analysis method (including the background correction, normalization and summarization of probes values) using the R environment and the Oligo library.³⁵ Transcript probes that did not correspond to known genes or matched with more than one gene in the GRCh37/hg19 human genome build (release 32) were discarded, and the study was finally restricted to 19 263 probes corresponding to 18 475 unique genes. Trans-eQTL analyses considering rs4938723 were performed with the R environment and the MatrixEQTL Package,³⁶ including gender and batch as covariates. FDR correction was applied for multiple comparisons and statistical significance was set at $P < 0.05$.

Functional- and pathway-enrichment analyses. MiRNA binding-site enrichment was explored using the WEB-based GENE SeT Analysis (WebGestalt) Toolkit (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>).³⁷ Functional and cluster overrepresentation analyses were performed considering Biological Process category from Gene Ontology using the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery resource (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>).³⁸ Evaluation of overall enrichment in direct and indirect interactions between encoded proteins from our gene set was addressed with Disease Association Protein-Protein Link Evaluator software (<http://www.broadinstitute.org/mpg/dapple/dapple.php>).³⁹ Enrichment analysis of canonical pathways and gene networks were performed using the Ingenuity Pathway Analysis software (Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA; <http://www.ingenuity.com>). Gene networks were considered of true relevance when the network score (P -score = $-\log_{10}(P$ -value)) was over 3 ($P = 10^{-3}$) and the total number of focus molecules was above 20 out of 35. Benjamini-Hochberg's correction was used to adjust for multiple comparisons and significance threshold was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Case-control association study between ADHD and genomic regions containing miRNAs or target genes

Assuming an OR of 1.2, the ADHD sample showed minimum statistical powers of 36%, 27% and 20% in the overall, combined and inattentive ADHD samples, respectively.

Single-marker and gene-based analyses

MiRNA and miRNA clusters: We studied 214 tagSNPs in 53 genomic regions spanning 143 miRNAs chosen on the basis of convergent evidence of the involvement of their target genes in ADHD or other psychiatric disorders in a total sample of 754 adults with ADHD and 766 controls. From the 203 successfully genotyped SNPs, eight were monomorphic ($MAF < 0.10$) and three had significant departure from HWE in the control sample ($P_{HWE} < 0.01$; Supplementary Table 2). After filtering for low call rate (subjects with $< 90\%$ of successfully genotyped SNPs) or gender discrepancy, a total of 23 individuals were discarded and, therefore, 192 SNPs with an average genotype call rate of 97.5% were finally considered in 748 cases and 749 controls.

When the whole ADHD sample was considered, nominal associations were found for eight SNPs located at five loci: the miR-128-2 locus and the clusters let-7a-1/let-7f-1/let-7d, let-7a-3/miR-4763/let-7b, miR-34b/c and miR-371/372/373 (Table 1a). None of them was located in the mature or precursor forms of the miRNAs and only rs28690953 within the miR-34b/c locus, 186 bp downstream of *MIR34C* gene, remained associated with ADHD after the FDR correction ($P = 8.8e - 04$ under a dominant model; Supplementary Figure 1). The gene-based analysis supported the association between miR-34b/c and let-7a-1/let-7f-1/let-7d clusters and ADHD ($P = 2.8e - 03$ and $P = 2.9e - 03$, respectively; Supplementary Table 3a).

MiRNA targets: We tested the association between ADHD and tagSNPs covering 3'-UTRs of 10 experimentally validated target genes for miR-34b and/or miR-34c (*BCL2*, *CREB1*, *CRHR1*, *HMG2A2*, *JAG1*, *MET*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3* and *VEGFA*). Of the 21 SNPs initially selected, three did not pass through the design pipeline,

Table 1. Single-marker association study in 754 adult ADHD patients and 766 sex-matched unrelated controls considering SNPs in (a) microRNA genes and (b) 3'-UTR of experimentally validated target genes

SNP (risk allele)	Genotypes*													
	Controls N (%)						Cases N (%)							
	11	12	22	11	12	22	P-value	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)		
(a) miRNA														
<i>hsa-miR-128-2</i>	205 (27.4)	388 (51.9)	155 (20.7)	245 (32.9)	365 (48.9)	136 (18.2)	0.064	1.18 (1.02–1.40)	0.028	1.18 (0.91–1.52)	0.224	1.30 (1.04–1.61)	0.022	
<i>hsa-miR-1590</i>	367 (49.2)	312 (41.8)	67 (9.0)	402 (53.8)	295 (39.5)	50 (6.7)	0.103	1.19 (1.01–1.39)	0.035	1.36 (0.94–2.00)	0.099	1.20 (0.98–1.47)	0.074	
<i>hsa-let-7a-1</i>	320 (43.0)	352 (47.2)	73 (9.8)	371 (50.3)	308 (41.7)	59 (8.0)	0.017	1.25 (1.06–1.47)	6.2e–03	1.25 (0.87–1.79)	0.222	1.35 (1.10–1.64)	4.7e–03	
<i>hsa-let-7f-1</i>														
<i>hsa-let-7d</i>	9 (1.2)	148 (19.9)	585 (78.9)	9 (1.2)	184 (24.7)	553 (74.1)	0.091	1.25 (1.00–1.56)	0.048	1.30 (1.02–1.65)	0.032	0.99 (0.39–2.52)	0.991	
<i>hsa-let-7a-3</i>														
<i>hsa-mir-4763</i>	432 (58.0)	275 (37.0)	37 (5.0)	476 (64.0)	236 (31.7)	32 (4.3)	0.065	1.23 (1.02–1.45)	0.030	1.62 (0.72–1.89)	0.538	1.28 (1.04–1.59)	0.019	
<i>hsa-let-7b</i>														
<i>hsa-miR-34b</i>	309 (41.5)	346 (46.5)	89 (12.0)	339 (45.6)	337 (45.4)	67 (9.0)	0.099	1.18 (1.01–1.37)	0.039	1.36 (0.98–1.92)	0.064	1.18 (1.22–1.45)	0.111	
<i>hsa-miR-34c</i>	18 (2.4)	178 (23.8)	553 (73.8)	23 (3.1)	231 (31.0)	492 (65.9)	3.9e–03	1.37 (1.12–1.66)	1.6e–03**	1.46 (1.17–1.82)	8.9e–04**	1.29 (0.69–2.41)	0.420	
<i>hsa-miR-371</i>														
<i>hsa-miR-372</i>	33 (4.4)	256 (34.3)	458 (61.3)	46 (6.2)	279 (37.3)	422 (56.5)	0.099	1.20 (1.01–1.43)	0.033	1.22 (0.99–1.50)	0.058	1.42 (0.90–2.25)	0.132	
<i>hsa-miR-373</i>														
(b) Gene														
<i>MET</i>	65 (8.8)	345 (46.5)	332 (44.7)	93 (12.4)	35 (48.1)	295 (39.5)	0.024	1.23 (1.06–1.44)	8.3e–03	1.24 (1.01–1.52)	0.040	1.48 (1.06–2.07)	0.021	
<i>NOTCH2</i>	212 (28.8)	367 (49.9)	157 (21.3)	245 (32.8)	377 (50.5)	125 (16.7)	0.048	1.19 (1.03–1.39)	0.017	1.35 (1.04–1.75)	0.024	1.20 (0.97–1.39)	0.096	
<i>HMG2</i>	561 (75.6)	164 (22.1)	17 (2.3)	596 (79.8)	146 (19.5)	5 (0.7)	0.011	1.31 (1.05–1.64)	0.015	3.45 (1.28–9.09)	7.7e–03	1.27 (1.00–1.64)	0.052	
	31 (4.2)	192 (26.0)	516 (69.8)	31 (4.1)	244 (32.6)	474 (63.3)	0.019	1.23 (1.02–1.47)	0.026	1.34 (1.08–1.67)	7.5e–03	0.99 (0.59–1.64)	0.957	

Abbreviations: ADHD, attention deficit hyperactivity disorder; CI, confidence interval; miRNA, microRNA; OR, odds ratio; SNP, single-nucleotide polymorphism; UTR, untranslated region. *Allele 1 denotes always risk allele and all calculations are performed considering this allele. **Statistically significant P-values after applying a false discovery rate of 20% (P-value < 1.58e–03 for the association tests with SNPs both in the miRNA genes and in the selected target genes).

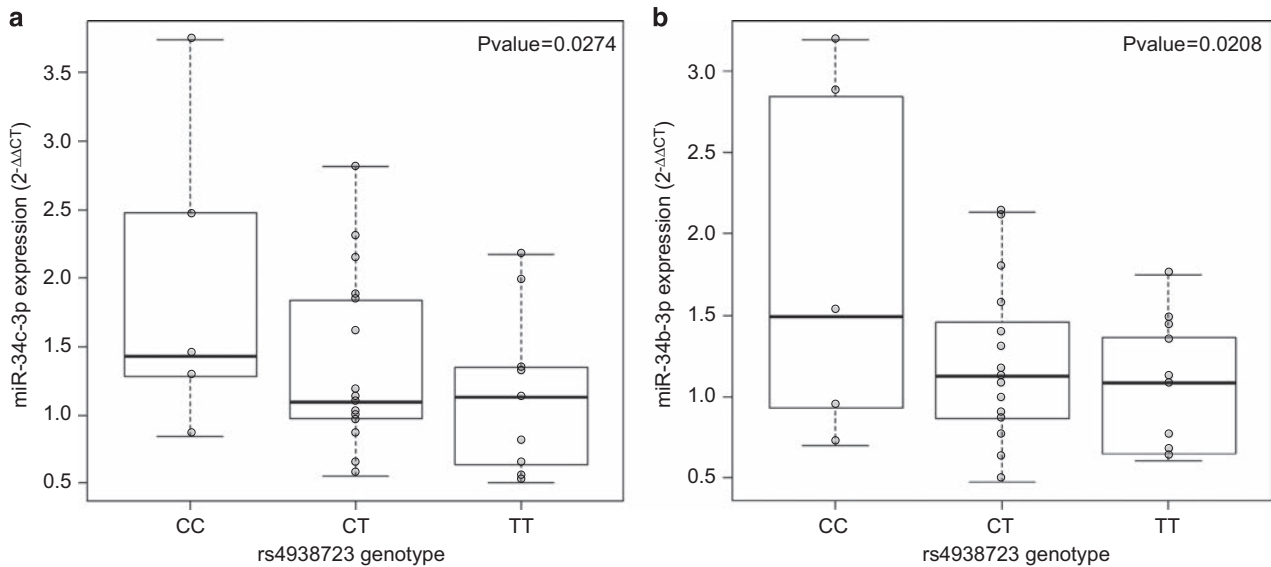


Figure 1. Graphical representation of significant *cis*-eQTL analysis between rs4938723 and $2^{-\Delta\Delta CT}$ expression values of (a) miR-34c-3p and (b) miR-34b-3p. eQTL, expression quantitative trait locus.

one was monomorphic (MAF < 0.10) and another had significant departure from HWE ($P_{HWE} < 0.01$; Supplementary Table 4). After filtering subjects with low call rate (< 90%), a total of 24 individuals were discarded and, therefore, 16 SNPs with an average genotype call rate of 97.5% were finally considered in 751 ADHD cases and 745 controls. The single-marker analysis showed nominal association between ADHD and four SNPs in three genes: rs1621 and rs6566 within the *MET* gene ($P = 8.3e-03$, OR = 1.23 (1.06–1.44) and $P = 0.017$, OR = 1.19 (1.03–1.39), respectively), rs699779 in the *NOTCH2* gene ($P = 7.7e-03$; OR = 3.45 (1.28–9.09)) and rs1175982 in the *HMG2* gene ($P = 7.5e-03$; OR = 1.34 (1.08–1.67); Table 1b, Supplementary Figure 1). None of them withstood FDR correction for multiple comparisons. The gene-based analysis supported the association between ADHD and the *MET* and *HMG2* genes ($P = 5.6e-03$ and $P = 7.1e-03$, respectively; Supplementary Table 3b). *NOTCH2* was not considered as it contained only one marker.

Analysis of additive and epistatic effects. As ADHD was associated with SNPs in the miR-34b/c cluster and in the 3'-UTRs of three validated target genes (*MET*, *NOTCH2* and *HMG2*), we further tested potential additive and epistatic effects among them. The combined effect of all ADHD risk variants was estimated to account for 3.2 and 4.5% of the variance of the overall ($P = 1.2e-06$) and combined ADHD ($P = 3.4e-07$), respectively, which resulted in sensibility and specificity values over 55%. No significant interactions between miR-34b/c and any of the targets genes were detected.

Gene expression assays

Expression analysis of miR-34b and miR-34c by qRT-PCR in ADHD subjects and controls. Expression levels of the mature forms of miR-34b and miR-34c were evaluated by qRT-PCR in PBMCs from 31 medication-naïve ADHD individuals and 32 controls. Significant overexpression of miR-34c-3p was identified in ADHD subjects ($P = 6.5e-03$; Exp(B) = 4.19; CI = 1.25–14.05), with 1.4-fold higher levels in patients as compared with controls. MiR-34b-3p also showed a trend towards increased expression in ADHD when compared with controls ($P = 0.058$; Exp(B) = 2.70; CI = 0.89–8.20) and no differences were observed for miR-34b-5p or miR-34c-5p.

Identification of cis-eQTLs in ADHD subjects by qRT-PCR. To determine whether expression differences in miR-34b and miR-34c resulted from allele-specific differences in the identified ADHD-associated risk locus, we searched for *cis*-eQTLs in PBMCs from a subset of 31 ADHD subjects from whom miR-34b/c genotypes and qRT-PCR expression data were available. Interestingly, a significant inverse correlation between the dosage of the rs4938723T allele in the promoter region of the primary transcript of miR-34b/c (pri-miR-34b/c) and expression levels of miR-34b-3p and miR-34c-3p was observed ($P = 0.021$, $\beta = -0.41$ and $P = 0.027$, $\beta = -0.44$, respectively; Figure 1). No differences were detected for miR-34b-5p and miR-34c-5p or when rs28690953 was considered.

Identification of trans-eQTLs in ADHD subjects by microarray assay. Next, we performed a transcriptome-wide *trans*-eQTL analysis considering the dosage of the *cis*-associated rs4938723T allele and microarray expression data from PBMCs of 45 ADHD subjects, which revealed 681 differentially expressed transcripts, 292 of which were upregulated and 389 downregulated ($P < 0.05$; Supplementary Table 5). Among them, we identified genes previously associated with ADHD in candidate-gene association studies and GWAS, such as *SYT2*, *HTR2C*, *SHFM1*, *DCLK1*, *TMX3*, *BDNF*, *VAMP2* or *TPH2* (Supplementary Table 6).

Functional- and pathway-enrichment analyses. Overrepresentation of miR-34b binding sites ($P = 1.64e-03$; Supplementary Table 7) as well as enrichment for indirect protein-protein interactions (seed indirect degrees mean = 55.11, $P = 0.042$) were identified considering the 681 differentially expressed transcripts from the *trans*-eQTL analyses (data not shown). Functional enrichment analyses revealed 36 categories nominally associated with our gene set, mainly related to lipid metabolism, and neuron dynamics and axonogenesis (Supplementary Table 8). Accordingly, the functional clustering showed two significantly enriched groups related to neuron development and differentiation, and axonogenesis (score = 1.6), and lipid biosynthesis and metabolism (score = 1.5; Supplementary Table 9). We also identified enrichment for categories related to psychiatric disorders such as 'susceptibility to attention deficit/hyperactivity disorder' ($P = 0.032$), 'refractory schizophrenia' ($P = 0.032$), major affective

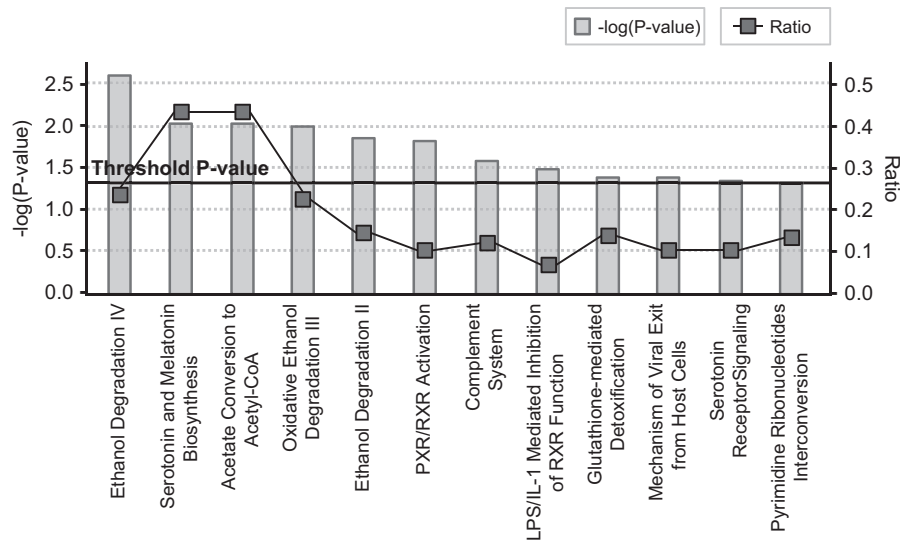


Figure 2. Significantly enriched canonical pathways considering differentially expressed genes identified in the trans-eQTL analysis. Along the x axis of the bar chart, the canonical pathways are shown. Along the left y axis, the statistical significance is indicated as $-\log(P\text{-value})$, calculated using the right-tailed Fisher's exact test. Gray bars denote statistical significance of the enrichment for each canonical pathway. The black straight line stands for the threshold above which there is significant enrichment (by default $P\text{-value} < 0.05$). Along the right y axis, the ratio parameter is shown, calculated by the numbers of genes in a given pathway that meet cutoff criteria, divided by total numbers of genes that make up that pathway. Black squares express the ratio for each pathway. eQTL, expression quantitative trait locus.

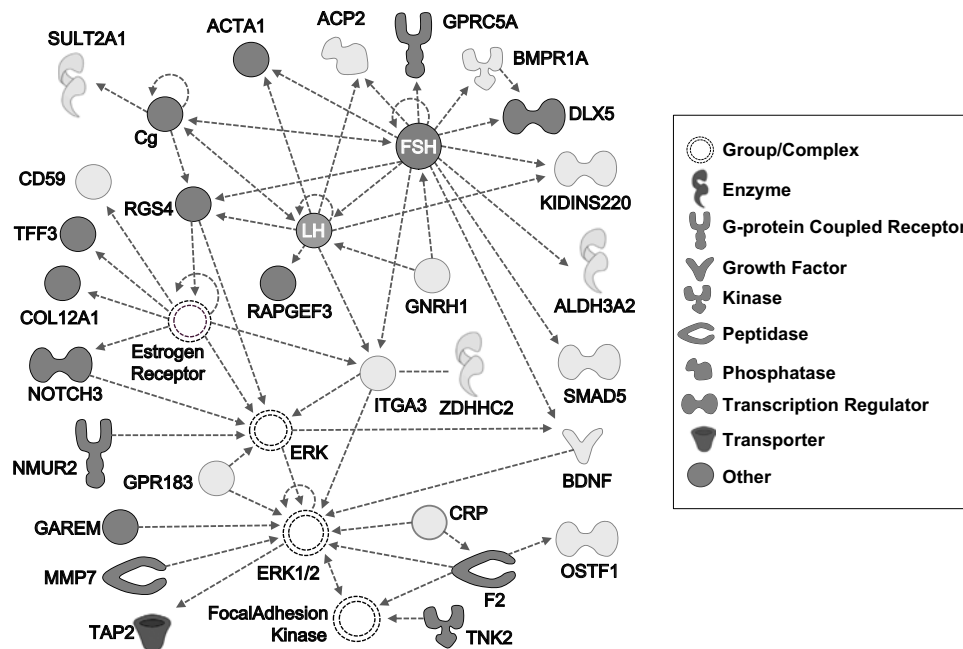


Figure 3. Ingenuity pathway best network (score = 37, focus molecules = 28) based on the top differentially expressed genes from the trans-eQTL analysis considering the rs4938723T risk variant in the pri-miR-34b/c promoter. Mapped molecules from the data set are represented as nodes with colored background and interacting proteins added from the Ingenuity database correspond to clear background nodes. Molecule over- and under-expression are denoted by light and dark gray coloring, respectively. eQTL, expression quantitative trait locus.

disorder ($P=0.032$), 'susceptibility to anorexia nervosa type II' ($P=0.032$) or 'susceptibility to bulimia nervosa type II' ($P=0.032$), as well as for neurologic diseases such as 'Huntington disease grade II' ($P=0.032$; data not shown). In addition, 12 canonical pathways were overrepresented in the gene set, among which we highlight 'Serotonin and Melatonin Biosynthesis' ($P=9.33e-03$) and 'Serotonin Receptor Signaling' ($P=0.046$; Figure 2). Interesting biological functions were also found enriched, such as 'synthesis of neurotransmitter' ($P=0.013$), 'release of neurotransmitter'

($P=8.43e-03$), 'influx of dopamine' ($P=0.032$), 'release of GABA' ($P=0.032$), 'synthesis of 5-hydroxytryptamine' ($P=9.32e-03$), 'recycling of synaptic vesicles' ($P=0.032$) or 'declarative memory' ($P=0.032$; data not shown). We also identified 20 significant networks, three of which had more than 20 focus molecules. The best generated network was highly scored (score = 37; focus molecules = 28), had follicle stimulating hormone as a central node and displayed 312 specific overrepresented functions and diseases (Figure 3, Supplementary Table 10).

DISCUSSION

Under the hypothesis that alterations affecting the expression, processing or target binding of miRNAs may result in functional alterations predisposing to ADHD, we explored whether common SNPs potentially affecting miRNA-mediated regulation are involved in this psychiatric disorder.

We found association between a sequence variant within the miR-34b/c locus and ADHD and provided preliminary evidence for overexpression of the miR-34c-3p mature form in PBMCs of ADHD subjects. We also assessed whether SNPs in the ADHD-associated locus that contains miR-34b/c were involved in the disorder through an effect on miRNA expression and found that rs4938723, located in the promoter region of the pri-miR-34b/c, tags *cis*-eQTLs for miR-34b-3p and miR-34c-3p. The rs4938723T allele dosage was associated with decreased expression levels of the mature forms of miR-34b and miR-34c in PBMCs of ADHD subjects, which is in concordance with previous studies showing correlation between the rs4938723C allele and a significant increase in luciferase activity.⁴⁰ Interestingly, this sequence variant is located within a CpG island, 423 bp upstream from the transcription start site of this cluster of miRNAs, and may affect a predicted GATA-binding site.⁴⁰

Recent investigations link miRNAs to psychiatric disorders including ADHD, schizophrenia, ASD, bipolar disorder and major depressive disorder.^{14,16,41} Specifically, although it has crucial roles in tumorigenesis, the miR-34 family participates in neuronal development, stem cell differentiation, ageing, spermatogenesis, as well as in metabolic and cardiovascular functions, and has been implicated in noncancerous diseases such as brain disorders, osteoporosis or cardiovascular complications.⁴² MiR-34b and miR-34c have been found downregulated in the amygdala, substantia nigra and frontal cortex in Parkinson's disease and have been linked to Alzheimer, anxiety or preclinical manifestation of Huntington's disease.^{43–46} Regarding psychiatric illness, miR-34a dysregulation has been associated with bipolar disorder, schizophrenia and major depressive disorder and a recent study reported aberrant expression of miR-34b and miR-34c in the peripheral blood of subjects with ASD.^{47–50}

In addition to genetic variants in miRNAs, we focused our case-control association study on several validated targets of miR-34b/c and found significant associations of ADHD with *MET*, *HMG2* and *NOTCH2* genes. Although not being previously related to ADHD, *MET* and *NOTCH2* have emerged as candidate genes for ASD.^{51,52} The *MET* gene might also be involved in schizophrenia, is highly expressed in the developing brain and has been implicated in GABAergic neuronal development, cortical thickness and connectivity in temporal-parietal regions affecting the Default Mode Network.^{51,53–55} The *MET* gene is known to mediate the association between air pollution and cognitive development, and independent studies have reported gene-environment interactions between *MET* gene variants and exposure to air pollutants in ASD.⁵⁶ Importantly, as ADHD and ASD often co-occur and share neuropsychological features, neurobiological substrates and increased risk after exposure to air pollutants, further studies are warranted to disentangle the role of *MET* gene in the overlapping genetic background between these disorders.^{4,57}

The transcriptome-wide *trans*-eQTL analysis considering the rs4938723 miR-34b/c polymorphism highlighted 681 transcripts, including genes previously implicated in ADHD. This gene set was mainly related to neurotransmission, neuron development and differentiation, axonal growth and guidance, cellular morphology and projection, as well as to lipid biosynthesis and metabolism, which is of particular importance in central nervous system (CNS) injuries and psychiatric disorders including ADHD.^{58,59} Among the top three genes, we found Synaptotagmin 2 (*SYT2*), an essential component of the calcium-triggering machinery for neurotransmitter release that was found associated with ADHD.⁶⁰ As

expected, among the *trans*-eQTLs, we also found experimentally validated miR-34b/c target genes, such as *NOTCH3*, enrichment for miR-34b/c binding sites, including predicted targets in ADHD-associated genes such as *HTR2C* and *VAMP2*, and genes related to different psychiatric disorders including schizophrenia, major affective disorder or eating disorders.⁵ Taken together, these data reinforce a possible scheme for miR-34b/c having a role in adult ADHD etiopathogenesis through a multifactorial mechanism integrating miRNAs as well as genes previously associated with ADHD and/or other psychiatric conditions.

There are several methodological considerations, however, that should be discussed. (1) The results of the present association study should be considered preliminary until further replication in additional cohorts. In this regard, we explored results of the ADHD GWAS meta-analysis from the Psychiatric Genomics Consortium and observed no significant association between rs28690953 or rs4938723 and ADHD ($P=0.56$ and $P=0.33$, respectively). Heterogeneity between populations, methodologies and statistical tests may explain discordant results across studies, making it difficult to reproduce the same findings and to establish direct comparisons between reports. Our study included only adult ADHD patients from Spain, whereas the Psychiatric Genomics Consortium sample consists mainly of children and adolescent Caucasians of European ancestry. These age differences as well as differential proportion of remitting and persisting ADHD subjects between samples may account for inconsistencies. Other explanations could also contribute to these discordant results, such as sample size, comorbid disorders as well as the proportions of clinical subtypes or genders. In addition, our findings regarding miR-34b and miR-34c expression levels also require replication in a larger and independent cohort as the limited sample size considered may have led to imprecise estimates of the magnitude of the miRNA expression differences and could have prevented us from detecting significant differences for miR-34b, which only displayed a trend towards significance. (2) The modest sample size of the association study may have prevented us from detecting susceptibility loci with very small effects in ADHD. In addition, although the study was designed to assure a full genetic coverage in terms of LD, the minimum MAF threshold was set at 0.10, which may also have led to an underestimation of the contribution of less common sequence variants. (3) Our inability to detect, in the single-marker analysis, the association between ADHD and rs4938723 that tags eQTLs for miR-34b and miR-34c, may be attributed to the complex genetic background of ADHD as well as potential gene-by-environment interactions, which might be particularly relevant in ADHD. (4) As one of the tagSNPs in the miR-34b/c locus could not be tested owing to experimental constraints, it is still possible that additional sequence variants in the region may contribute to the dysregulation of miR-34b and/or miR-34c. (5) The selection of the FDR approach as the multiple-testing correction method rather than other more conservative strategies, such as Bonferroni, was based on the fact that the latter may be too stringent to identify subtle genetic factors involved in the etiology of a complex disease. In addition, the Bonferroni correction requires independence between all performed tests and, therefore, may be too restrictive in our study as some of the selected SNPs show some degree of LD (LD threshold: $r^2=0.85$), and the different inheritance models tested for some of the SNPs are not fully independent. (6) Although SNPs in 3'-UTR regions that are targeted by miR-34b or miR-34c were selected solely on the basis of genetic coverage criteria, prediction of the functional significance of the ADHD risk variants in *MET*, *NOTCH2* and *HMG2* genes supports their impact on miRNA target site recognition but none of them involved miR-34. (7) As we limited the gene expression analyses to miRNAs and SNPs showing significant evidence for association with ADHD, we cannot rule out the contribution to ADHD of other variants affecting the processing or target binding of miRNAs. (8) All the participants were recruited by

a single clinical group in a restricted geographic area (Barcelona), and the diagnosis of ADHD was based on structured interviews with no variability in measurements across data. In addition, expression patterns were assessed in medication-naïve subjects with no comorbid disorders, which may facilitate the identification of ADHD-related transcriptional signatures that might be neglected by a broader recruitment strategy. (9) The expression experiments were performed in PBMCs and, therefore, further evidence in brain tissues is required to disentangle the involvement of miR-34b and miR-34c in ADHD. It is worth pointing out, however, that the expression profiling of miRNAs shows correlation between brain and PBMCs, where both tissues cluster together based on the pattern of miRNA expression.⁶¹ A recent meta-analysis also showed that *cis*-eQTLs in the peripheral blood and brain display strong overlap and that there is solid evidence supporting PBMCs as a proxy to study transcriptional and epigenetic biosignature in different psychiatric disorders.⁶² Consistently, at the transcriptome level, whole blood also shares significant gene expression similarities with multiple CNS tissues, suggesting that the use of peripheral gene expression may be a useful surrogate for gene expression in the CNS.⁶³ Furthermore, similarities between the mechanisms of transduction and receptor expression in cells of the CNS and blood lymphocytes have also been described.⁶⁴ In this sense, disturbances in cellular functions and metabolism in the CNS, as well as alterations in the major neurotransmitter and hormonal systems, have been identified in neuropsychiatric disorders concomitant with altered functioning and metabolism of lymphocytes, which also support that the latter could reflect the metabolism in brain cells.^{64,65}

In conclusion, to our knowledge, this is the first comprehensive attempt to evaluate whether miRNAs are involved in ADHD and we identified sequence variants in the pri-miR-34b/c associated with ADHD and with expression levels of the mature forms of miR-34b and miR-34c in ADHD subjects. This work increases the understanding of biological mechanisms by which epigenetic functions may contribute to ADHD and highlights the importance of miRNAs in the etiology of the disorder.

CONFLICT OF INTEREST

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

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to patients and controls who kindly participated in this research. The microarrays service was carried out at High Technology Unit (UAT) at Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), Barcelona (Spain) and the Statistics and Bioinformatics Unit (UEB) at the VHIR provided statistical support. Over the course of this investigation, IG-M has been a recipient of a predoctoral fellowship from the Vall d'Hebron Research Institute (PRED-VHIR-2012) and she currently is a recipient of a contract from the 7th Framework Programme for Research, Technological Development and Demonstration, European Commission (AGGRESSOTYPE_FP7HEALTH2013/602805). CS-M was a recipient of a contract from the 7th Framework Programme for Research, Technological Development and Demonstration, European Commission (AGGRESSOTYPE_FP7HEALTH2013/602805) and she currently is a recipient of a Sara Borrell contract from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (CD15/00199). MP is recipient of a predoctoral fellowship from the Vall d'Hebron Research Institute (PRED-VHIR-2013). MR is a recipient of a Miguel de Servet contract from the Instituto de Salud Carlos III, Spain (CP09/00119 and CPII15/00023). This investigation was supported by Instituto de Salud Carlos III (PI11/00571, PI11/01629, PI12/01139, PI14/01700), and co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF), Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca-AGAUR, Generalitat

de Catalunya (2014SGR1357, 2014SGR0932), Ministerio de Economía y Competitividad, Spain (SAF2012-33484, SAF2015-68341-R), the European College of Neuropsychopharmacology (ECNP network: 'ADHD across the lifespan'), Departament de Salut, Government of Catalonia, Spain and a NARSAD Young Investigator Grant from the Brain & Behavior Research Foundation. This project has also received funding from the European Union's Horizon 2020 Research And Innovation Programme under the grant agreement Nos 667302 (CoCA) and 643051 (MiND).

REFERENCES

- Willcutt EG. The prevalence of DSM-IV attention-deficit/hyperactivity disorder: a meta-analytic review. *Neurotherapeutics* 2012; **9**: 490–499.
- Thapar A, Cooper M, Eyre O, Langley K. What have we learnt about the causes of ADHD? *J Child Psychol Psychiatry* 2013; **54**: 3–16.
- Hawi Z, Cummins TD, Tong J, Johnson B, Lau R, Samrair W et al. The molecular genetic architecture of attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 2015; **20**: 289–297.
- Lee SH, Ripke S, Neale BM, Faraone SV, Purcell SM, Perlis RH et al. Genetic relationship between five psychiatric disorders estimated from genome-wide SNPs. *Nat Genet* 2013; **45**: 984–994.
- Li Z, Chang SH, Zhang LY, Gao L, Wang J. Molecular genetic studies of ADHD and its candidate genes: a review. *Psychiatry Res* 2014; **219**: 10–24.
- Faraone SV, Asherson P, Banaschewski T, Biederman J, Buitelaar JK, Ramos-Quiroga JA et al. Attention-deficit/hyperactivity disorder. *Nat Rev Dis Primers* 2015; **1**: 15020.
- Sanchez-Mora C, Ramos-Quiroga JA, Bosch R, Corrales M, Garcia-Martinez I, Nogueira M et al. Case-control genome-wide association study of persistent attention-deficit hyperactivity disorder identifies FBXO33 as a novel susceptibility gene for the disorder. *Neuropsychopharmacology* 2015; **40**: 915–926.
- Zayats T, Athanasiu L, Sonderby I, Djurovic S, Westlye LT, Tamnes CK et al. Genome-wide analysis of attention deficit hyperactivity disorder in Norway. *PLoS One* 2015; **10**: e0122501.
- Stranger BE, Nica AC, Forrest MS, Dimas A, Bird CP, Beazley C et al. Population genomics of human gene expression. *Nat Genet* 2007; **39**: 1217–1224.
- Cipolla GA. A non-canonical landscape of the microRNA system. *Front Genet* 2014; **5**: 337.
- Lu J, Clark AG. Impact of microRNA regulation on variation in human gene expression. *Genome Res* 2012; **22**: 1243–1254.
- Adlakha YK, Saini N. Brain microRNAs and insights into biological functions and therapeutic potential of brain enriched miRNA-128. *Mol Cancer* 2014; **13**: 33.
- Ripke S, Sanders AR, Kendler KS, Levinson DF, Sklar P, Holmans PA et al. Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nat Genet* 2011; **43**: 969–976.
- Geaghan M, Cairns MJ. MicroRNA and posttranscriptional dysregulation in psychiatry. *Biol Psychiatry* 2015; **78**: 231–239.
- Nemeth N, Kovacs-Nagy R, Szekeley A, Sasvari-Szekeley M, Ronai Z. Association of impulsivity and polymorphic microRNA-641 target sites in the SNAP-25 gene. *PLoS One* 2013; **8**: e84207.
- Sanchez-Mora C, Ramos-Quiroga JA, Garcia-Martinez I, Fernandez-Castillo N, Bosch R, Richarte V et al. Evaluation of single nucleotide polymorphisms in the miR-183-96-182 cluster in adulthood attention-deficit and hyperactivity disorder (ADHD) and substance use disorders (SUDs). *Eur Neuropsychopharmacol* 2013; **23**: 1463–1473.
- Kandemir H, Erdal ME, Selek S, Ay OI, Karababa IF, Kandemir SB et al. Evaluation of several micro RNA (miRNA) levels in children and adolescents with attention deficit hyperactivity disorder. *Neurosci Lett* 2014; **580**: 158–162.
- Epstein J, Johnson D, Conners K. *Adult ADHD Diagnostic Interview for DSM-IV*. Multi-Health Systems: North Tonawanda, NY, USA, 1999.
- Conners CK. The computerized continuous performance test. *Psychopharmacol Bull* 1985; **21**: 891–892.
- DuPaul G, Power T, Anastopoulos A, Reid R. *ADHD Rating Scales, IV: Checklists, Norms, and Clinical Interpretation*. Guilford Press: New York, NY, USA, 1998.
- Hugh F. *Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Adults: A Guide*. Rockston Ink: The Progressive Press: Madison, WI, USA, 2002; 52–54.
- Ward MF, Wender PH, Reimherr FW. The Wender Utah Rating Scale: an aid in the retrospective diagnosis of childhood attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* 1993; **150**: 885–890.
- NIMH. CGI Clinical Global Impression Scale. *Psychopharmacol Bull* 1985; **21**: 839–844.
- Sheehan D. *The Anxiety Disease*. Charles Scribner's Sons: New York, NY, USA, 1983.
- Ribas M, Ramos-Quiroga JA, Hervas A, Bosch R, Bielsa A, Gastaminza X et al. Exploration of 19 serotonergic candidate genes in adults and children with attention-deficit/hyperactivity disorder identifies association for 5HT2A, DDC and MAOB. *Mol Psychiatry* 2009; **14**: 71–85.

- 26 Xiao F, Zuo Z, Cai G, Kang S, Gao X, Li T. miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res* 2009; **37**(Database issue): D105–D110.
- 27 Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; **120**: 15–20.
- 28 Vergoulis T, Vlachos IS, Alexiou P, Georgakakis G, Maragkakis M, Reczko M *et al*. TarBase 6.0: capturing the exponential growth of miRNA targets with experimental support. *Nucleic Acids Res* 2011; **40**(Database issue): D222–D229.
- 29 Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* 2008; **36**(Database issue): D154–D158.
- 30 Ribases M, Hervas A, Ramos-Quiroga JA, Bosch R, Bielsa A, Gastaminza X *et al*. Association study of 10 genes encoding neurotrophic factors and their receptors in adult and child attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 2008; **63**: 935–945.
- 31 Gonzalez JR, Armengol L, Sole X, Guino E, Mercader JM, Estivill X *et al*. SNPpass: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* 2007; **23**: 644–645.
- 32 Bass J, Dabney A, Robinson D. qvalue: Q-value estimation for false discovery rate control. *R package version 2.2.0*, 2015.
- 33 Mishra A, Macgregor S. VEGAS2: software for more flexible gene-based testing. *Twin Res Hum Genet* 2015; **18**: 86–91.
- 34 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; **25**: 402–408.
- 35 Carvalho BS, Irizarry RA. A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinformatics* 2010; **26**: 2363–2367.
- 36 Shabalin AA. Matrix eQTL: ultra fast eQTL analysis via large matrix operations. *Bioinformatics* 2012; **28**: 1353–1358.
- 37 Wang J, Duncan D, Shi Z, Zhang B. WEB-based GENE SeT Analysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. *Nucleic Acids Res* 2013 **41**(Web Server issue): W77–W83.
- 38 Huang, da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009; **4**: 44–57.
- 39 Rossin EJ, Lage K, Raychaudhuri S, Xavier RJ, Tatar D, Benita Y *et al*. Proteins encoded in genomic regions associated with immune-mediated disease physically interact and suggest underlying biology. *PLoS Genet* 2011; **7**: e1001273.
- 40 Tong N, Chu H, Wang M, Xue Y, Du M, Lu L *et al*. Pri-miR-34b/c rs4938723 polymorphism contributes to acute lymphoblastic leukemia susceptibility in Chinese children. *Leuk Lymphoma* 2015; 1–19.
- 41 Toma C, Torrico B, Hervás A, Salgado M, Rueda I, Valdés-Mas Ret *et al*. Common and rare variants of microRNA genes in autism spectrum disorders. *World J Biol Psychiatry* 2016.
- 42 Rokavec M, Li H, Jiang L, Hermekeing H The p53/miR-34 axis in development and disease. *J Mol Cell Biol* 2014; **6**: 214–230.
- 43 Gaughwin PM, Ciesla M, Lahiri N, Tabrizi SJ, Brundin P, Bjorkqvist M. Hsa-miR-34b is a plasma-stable microRNA that is elevated in pre-manifest Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 2011; **20**: 2225–2237.
- 44 Haramati S, Navon I, Issler O, Ezra-Nevo G, Gil S, Zwang R *et al*. MicroRNA as repressors of stress-induced anxiety: the case of amygdalar miR-34. *J Neurosci* 2011; **31**: 14191–14203.
- 45 Minones-Moyano E, Porta S, Escaramis G, Rabionet R, Iraola S, Kagerbauer B *et al*. MicroRNA profiling of Parkinson's disease brains identifies early downregulation of miR-34b/c which modulate mitochondrial function. *Hum Mol Genet* 2011; **20**: 3067–3078.
- 46 Zovoilis A, Agbemenyah HY, Agis-Balboa RC, Stilling RM, Edbauer D, Rao P *et al*. microRNA-34c is a novel target to treat dementias. *EMBO J* 2011; **30**: 4299–4308.
- 47 Bavamian S, Mellios N, Lalonde J, Fass DM, Wang J, Sheridan SD *et al*. Dysregulation of miR-34a links neuronal development to genetic risk factors for bipolar disorder. *Mol Psychiatry* 2015; **20**: 573–584.
- 48 Huang F, Long Z, Chen Z, Li J, Hu Z, Qiu R *et al*. Investigation of gene regulatory networks associated with autism spectrum disorder based on MiRNA expression in China. *PLoS One* 2015; **10**: e0129052.
- 49 Kim AH, Reimers M, Maher B, Williamson V, McMichael O, McClay JL *et al*. MicroRNA expression profiling in the prefrontal cortex of individuals affected with schizophrenia and bipolar disorders. *Schizophr Res* 2010; **124**: 183–191.
- 50 Wan Y, Liu Y, Wang X, Wu J, Liu K, Zhou J *et al*. Identification of differential microRNAs in cerebrospinal fluid and serum of patients with major depressive disorder. *PLoS One* 2015; **10**: e0121975.
- 51 Rudie JD, Hernandez LM, Brown JA, Beck-Pancer D, Colich NL, Gorrindo P *et al*. Autism-associated promoter variant in MET impacts functional and structural brain networks. *Neuron* 2012; **75**: 904–915.
- 52 Garbett K, Ebert PJ, Mitchell A, Lintas C, Manzi B, Mirnics K *et al*. Immune transcriptome alterations in the temporal cortex of subjects with autism. *Neurobiol Dis* 2008; **30**: 303–311.
- 53 Burdick KE, DeRosse P, Kane JM, Lencz T, Malhotra AK. Association of genetic variation in the MET proto-oncogene with schizophrenia and general cognitive ability. *Am J Psychiatry* 2010; **167**: 436–443.
- 54 Hedrick A, Lee Y, Wallace GL, Greenstein D, Clasen L, Giedd JN *et al*. Autism risk gene MET variation and cortical thickness in typically developing children and adolescents. *Autism Res* 2012; **5**: 434–439.
- 55 Martins GJ, Shahrokh M, Powell EM. Genetic disruption of Met signaling impairs GABAergic striatal development and cognition. *Neuroscience* 2011; **176**: 199–209.
- 56 Volk HE, Kerin T, Lurmann F, Hertz-Picciotto I, McConnell R, Campbell DB. Autism spectrum disorder: interaction of air pollution with the MET receptor tyrosine kinase gene. *Epidemiology* 2014; **25**: 44–47.
- 57 Berenguer-Fomer C, Miranda-Casas A, Pastor-Cerezuela G, Rosello-Miranda R. [Comorbidity of autism spectrum disorder and attention deficit with hyperactivity. A review study]. *Rev Neurol* 2015; **60**(Suppl 1): S37–S43.
- 58 Bazinet RP, Layé S. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat Rev Neurosci* 2014; **15**: 771–785.
- 59 Young GS, Maharaj NJ, Conquer JA. Blood phospholipid fatty acid analysis of adults with and without attention deficit/hyperactivity disorder. *Lipids* 2004; **39**: 117–123.
- 60 Sanchez-Mora C, Cormand B, Ramos-Quiroga JA, Hervas A, Bosch R, Palomar G *et al*. Evaluation of common variants in 16 genes involved in the regulation of neurotransmitter release in ADHD. *Eur Neuropsychopharmacol* 2013; **23**: 426–435.
- 61 Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics* 2007; **8**: 166.
- 62 Kim Y, Xia K, Tao R, Giusti-Rodriguez P, Vladimirov V, van den Oord E *et al*. A meta-analysis of gene expression quantitative trait loci in brain. *Transl Psychiatry* 2014; **4**: e459.
- 63 Sullivan PF, Fan C, Perou CM. Evaluating the comparability of gene expression in blood and brain. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006; **141B**: 261–268.
- 64 Gladkevich A, Kauffman HF, Korf J. Lymphocytes as a neural probe: potential for studying psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004; **28**: 559–576.
- 65 Glatt SJ, Everall IP, Kremen WS, Corbeil J, Sásik R, Khanlou N *et al*. Comparative gene expression analysis of blood and brain provides concurrent validation of SELENBP1 up-regulation in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 15533–15538.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016

Supplementary Information accompanies the paper on the Translational Psychiatry website (<http://www.nature.com/tp>)

2. SECCIÓ 2

Estudi de la base genètica del TDAH per mitjà de l'anàlisi massiu de variants genètiques: Estudis d'associació a escala genòmica (GWAS) basats en variants polimòrfiques de nucleòtid únic (SNP) i basats en gens, i anàlisis d'enriquiment funcional i vies de senyalització cel·lular.

2.1. Article 3 (Annex 2)

Sánchez-Mora C, Ramos-Quiroga JA, Bosch R, Corrales M, Garcia-Martínez I, Nogueira M, Pagerols M, Palomar G, Richarte V, Vidal R, Arias-Vasquez A, Bustamante M, Forns J, Gross-Lesch S, Guxens M, Hinney A, Hoogman M, Jacob C, Jacobsen KK, Kan CC, Kiemenev L, Kittel-Schneider S, Klein M, Onnink M, Rivero O, Zayats T, Buitelaar J, Faraone SV, Franke B, Haavik J, Johansson S, Lesch KP, Reif A, Sunyer J, Bayés M, Casas M, Cormand B, Ribasés M. **Case-control genome-wide association study of persistent attention-deficit hyperactivity disorder identifies *FBXO33* as a novel susceptibility gene for the disorder.** *Neuropsychopharmacology*. 2015 Mar; **40(4)**: 915-26.

Resum

S'estima que un 15% dels individus amb TDAH a la infantesa seguiran presentant el trastorn a l'edat adulta, acomplint tots els criteris diagnòstics, i que entre un 65%-71% presentaran formes de remissió parcial, amb persistència de dèficits funcionals o amb símptomes incapacitants. Amb l'objectiu d'identificar nous gens implicats en la persistència del trastorn, s'ha realitzat un GWAS en 607 adults amb TDAH i 584 controls, i una rèplica i una metanàlisi considerant tres poblacions europees independents, en una mostra de 2.104 individus amb TDAH i 1.901 controls. Tot i que cap dels resultats supera el llindar de significació genòmica (P -valor $<5e-08$), s'han trobat evidències de la implicació del gen que codifica per la proteïna amb caixa F 33 (*FBXO33*) en el TDAH de subtipus combinat, tant en la mostra de descobriment com a l'anàlisi de seguiment considerant la mostra inicial i la de rèplica conjuntament. Addicionalment, s'han reportat evidències del paper del gen *FBXO33* i de la via ubiquitina-proteosoma en el TDAH a través d'aproximacions basades en gens i d'anàlisis d'enriquiment funcional i de vies de senyalització. A més, s'ha detectat que alguns dels al·lels de risc pel TDAH s'associen a una menor expressió del *FBXO33* en línies cel·lulars limfoblastoides, així com a una reducció del volum de la matèria gris frontal en subjectes adults sans.

Aquests resultats recolzen el gen *FBXO33* i la maquinària d'ubiquitinització com a nou mecanisme implicat en el TDAH, i estableixen una base per a la recerca de variants de risc addicionals en gens relacionats amb aquest procés.

El contingut referent a aquest manuscrit es troba a l'Annex 2.

2.2. Article 4

Garcia-Martínez J, Sánchez-Mora C, Soler M, Rovira P, Pagerols M, Corrales M, Calvo-Sánchez E, Richarte V, Cormand B, Casas M, Ramos-Quiroga JA, Ribasés M. **Gene-wide Association Study reveals *RNF122* Ubiquitin Ligase as a Novel Susceptibility Gene for Attention Deficit Hyperactivity Disorder.** *Scientific Reports*. 2017. Acceptat. En premsa.

Resum

Donades les limitacions mostrades per l'abordatge genètic basat en aproximacions de gens candidats i a escala genòmica (GWAS) en l'estudi del TDAH, en el present estudi s'han considerat les dades pre-existents del GWAS en TDAH basat en polimorfismes de nucleòtid únic (SNPs) -realitzat anteriorment pel nostre equip investigador- per aplicar un abordatge basat en gens, complementat amb anàlisis d'enriquiment funcional i de vies de senyalització, en una mostra de 607 subjectes amb TDAH persistent i 584 controls. Addicionalment, per aquells gens que han mostrat significació per sota del llindar de seguiment establert a $P\text{-valor} < 1e-03$ en les anàlisis basades en gens, s'han estudiat els perfils d'expressió en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs) de 45 subjectes adults amb TDAH naïves per a tractament farmacològic, i 39 controls sans no-relacionats. Mitjançant aquest abordatge s'ha identificat l'associació entre el gen *RNF122* i el TDAH, així com la seva sobre-expressió en PBMCs de subjectes adults amb el trastorn en comparació amb individus sans.

El gen *RNF122* és un enzim E3 ubiquitina-ligasa que actua com a mediador essencial de l'especificitat de la unió de la ubiquitina al substrat corresponent en el procés de degradació de les proteïnes mediat pel proteosoma. Per tant, aquests resultats estan en consonància amb dades prèvies que situen el sistema ubiquitina-proteosoma com a un candidat prometedor a participar en l'etiologia del TDAH.

Gene-wide Association Study Reveals *RNF122* Ubiquitin Ligase as a Novel Susceptibility Gene for Attention Deficit Hyperactivity Disorder

^aIris Garcia-Martínez¹⁻², ^aCristina Sánchez-Mora¹⁻³, Maria Soler¹⁻³, Paula Rovira¹⁻², Mireia Pagerols¹⁻², Montse Corrales^{2,4}, Eva Calvo-Sánchez¹⁻², Vanesa Richarte²⁻⁴, Mariona Bustamante⁵⁻⁸, Jordi Sunyer^{5,7-9}, Bru Cormand¹⁰⁻¹³, Miquel Casas¹⁻⁴, Josep Antoni Ramos-Quiroga¹⁻⁴, ***Marta Ribasés**¹⁻³.

¹Psychiatric Genetics Unit, Group of Psychiatry, Mental Health and Addiction, Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain.

²Department of Psychiatry, Mental Health and Addictions, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Catalonia, Spain.

³Biomedical Network Research Centre on Mental Health (CIBERSAM), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

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

⁵ISGlobal, Centre for Research in Environmental Epidemiology (CREAL), Barcelona, Spain

⁶Genomics and Disease Group, Bioinformatics and Genomics Program, Centre for Genomic Regulation (CRG), Barcelona, Spain

⁷Universitat Pompeu Fabra (UPF), Barcelona, Spain

⁸CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Spain

⁹IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Barcelona, Spain

¹⁰Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain.

¹¹Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

¹²Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Catalonia, Spain.

¹³Institut de Recerca Sant Joan de Déu (IR-SJD), Esplugues, Catalonia, Spain

^aEqually contributed.

*Correspondence: **Marta Ribasés**, Psychiatric Genetics Unit, Vall d'Hebron Research Institute, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain; e-mail: marta.ribases@vhir.org

ABSTRACT

Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) is a common childhood-onset neurodevelopmental condition characterized by pervasive impairment of attention, hyperactivity, and/or impulsivity that can persist into adulthood. The aetiology of ADHD is complex and multifactorial and, despite the wealth of evidence for its high heritability, genetic studies have provided modest evidence for the involvement of specific genes and have failed to identify consistent and replicable results. Due to the lack of robust findings, we performed gene-wide and pathway enrichment analyses using pre-existing GWAS data from 607 persistent ADHD subjects and 584 controls, produced by our group. Subsequently, expression profiles of genes surpassing a follow-up threshold of $P\text{-value} < 1e-03$ in the gene-wide analyses were tested in peripheral blood mononucleated cells (PBMCs) of 45 medication-naïve adults with ADHD and 39 healthy unrelated controls. We found preliminary evidence for genetic association between *RNF122* and ADHD and for its overexpression in adults with ADHD. *RNF122* is an E3 ubiquitin ligase involved in the proteasome-mediated processing, trafficking, and degradation of proteins that acts as an essential mediator of the substrate specificity of ubiquitin ligation. Thus, our findings add to previous data that place the ubiquitin-proteasome system as a promising candidate for its involvement in the aetiology of ADHD.

INTRODUCTION

Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) is a common childhood-onset neurodevelopmental disorder with a high estimated prevalence of 5.3% among children and of 2.5% in adulthood [1]. Family and twin studies have shown that genetic factors play a crucial role in ADHD susceptibility and have estimated the heritability of the disorder to be around 76-80% both in children and in adults [1].

In spite of this high heritability, genome-wide linkage studies or hypothesis-driven candidate gene association analyses in ADHD have failed to identify consistent and replicable genetic factors, and provide modest evidence for the involvement of some specific genes on the basis of meta-analyses [2-5]. Aiming to overcome these issues, and along with advances in high-throughput technologies, a number of genome-wide association studies (GWAS) has been performed in ADHD in the last few years. It has been reported that around 28% of the total variance in the liability to ADHD may be explained by common nucleotide polymorphisms (SNPs), and that a considerable part of this estimated SNP-based

heritability might be shared with different psychiatric disorders [6-7]. GWAS in ADHD have shown suggestive evidence for association of cadherin 13 (*CDH13*) and other candidate genes, including monoamine system-related genes (e.g. *SLC9A9* and *SNAP25*), the glutamate metabotropic receptor 5 (*GRM5*), the glucose-fructose oxidoreductase domain containing 1 (*GFOD1*), the cannabinoid receptor 1 (*CNR1*), the protein kinase CGMP-dependent 1 (*PRKG1*) or the nicotinic acetylcholine receptor alpha 7 (*CHRNA7*), among others [2-4, 8]. However, no genome-wide significant findings have been identified [$P \leq 5e-8$], there is limited overlap between results from different GWAS, and none of the classical candidate genes for ADHD has been found among the top findings. These results may reflect differences in study design or phenotypes analyzed in the different GWAS performed so far, and suggest that larger samples, more homogeneous populations and more complex statistical strategies are required to identify genetic variants displaying low to moderate effects in ADHD [4, 8].

Considering the absence of genome-wide significant associations and the limited overlap between top hits from SNP-based GWAS on ADHD, analyses focusing on gene-set enrichment or pathway-based approaches raise as promising strategies to address the genetic complexity of the disorder [9]. These strategies allow combining effects of multiple SNPs (gene-wide studies) or multiple genes (gene-set analyses), while reducing multiple testing comparisons and providing insights into the involvement of specific biological functions or pathways. [9]. In this line, Mick *et al.* performed gene-wide analyses and provided additional evidence for the association between ADHD and the solute carrier *SLC9A9*, a candidate gene for the disorder that had been found nominally associated with ADHD in other SNP-based GWAS [2-4, 8]. Gene-set enrichment approaches or pathway analyses on ADHD also highlighted genes involved in the regulation of gene expression, cell adhesion and inflammation, ubiquitin proteasomal degradation, neurodegenerative disorders, axon guidance, neuron projections or synaptic components, and revealed significant overlap between pathways enriched for SNP association and those enriched for rare copy number variants (CNV) [2-4, 8]. To integrate findings from GWAS and provide knowledge about potential molecular processes underlying ADHD, Poelmans *et al.* performed network analysis considering top findings from five GWAS and revealed that 45 of the 85 top-ranked ADHD candidate genes encoded proteins that fitted into a neurodevelopmental network involved in directed neurite outgrowth [10]. Recently, the Psychiatric Genomics Consortium (PGC) combined GWAS signals from over 60,000 subjects to identify common network and biological pathways across three adult psychiatric conditions: schizophrenia, major depression and bipolar disorder. This study highlighted an important overlap across disorders, with histone methylation processes showing the strongest association, as well as multiple immune and neuronal signaling pathways [11].

Due to the lack of robust findings in ADHD through SNP-based GWAS, which may be explained by the lack of power of the studies conducted so far and the polygenic, multifactorial nature of the disorder -with common and rare variants likely contributing small to moderate effects to its etiology-, we performed gene-wide and pathway enrichment analyses using GWAS data from 607 persistent ADHD subjects and 584 controls. Subsequently, expression profiles of genes surpassing a follow-up significance threshold of $P\text{-value} < 1e-03$ in the gene-wide analyses were tested in peripheral blood mononucleated cells (PBMCs) of 45 medication-naive adults with ADHD and 39 healthy unrelated controls.

MATERIALS AND METHODS

Subjects and Clinical Assessment

The clinical sample consisted of 607 adult ADHD subjects and 584 unrelated healthy individuals, all Spanish and Caucasian. Detailed information regarding the sample is described elsewhere [12].

The evaluation of the ADHD diagnosis was carried out with the Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I and II Disorders (SCID-I and SCID-II) and with the Conners' Adult ADHD Diagnostic Interview for DSM-IV (CAADID parts I and II) [13]. Severity of ADHD symptoms in adulthood was assessed with the long version of the Conners' ADHD Rating Scale (self-report [CAARS-S:L] and observer [CAARS-O:L]) [14], the ADHD Rating Scale (ADHD-RS) [15] and the Wender Utah Rating Scale (WURS) for retrospective symptomatology in childhood [16]. The level of impairment was measured with the Clinical Global Impression (CGI) and the Sheehan Disability Inventory [17-18]. Additional tests used for clinical assessment are available in Ribasés *et al.* [19]. Exclusion criteria were $IQ < 70$; lifelong and current history of mood, psychotic, anxiety, substance abuse, and DSM-IV axis II disorders; pervasive developmental disorders; a history or the current presence of a condition or illness, including neurologic, metabolic, cardiac, liver, kidney, or respiratory disease; a chronic medication of any kind; birth weight ≤ 1.5 kg; and other neurological or systemic disorders that might explain ADHD symptoms.

The control sample consisted of unrelated healthy individuals matched for sex with the clinical group. ADHD symptomatology was excluded retrospectively under the following criteria: 1) not having been diagnosed with ADHD previously and 2) answering negatively to the life-time presence of the following ADHD symptoms: a) often has trouble in keeping attention on tasks; b) usually loses things needed for tasks; c) often fidgets with hands or feet or squirms in seat and d) often gets up from seat when remaining in seat is expected.

All subjects were evaluated and recruited at Hospital Universitari Vall d'Hebron of Barcelona (Spain) and diagnosis was blind to genotype. The study was approved by the Clinical Research Ethics Committee (CREC) of Hospital Universitari Vall d'Hebron, all methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations and written informed consent was obtained from all subjects before the inclusion into the study.

Gene-wide Analysis

Genome-wide genotyping of 607 adults with ADHD and 584 healthy controls was performed with the Illumina HumanOmni1-Quad BeadChip platform [Illumina Inc., San Diego, California, USA]. Quality control assessment was implemented at the individual and SNP level using PLINK v1.07 [20] and included filtering subjects with low call rate (<98%) or gender discrepancy, followed by filtering SNPs with minor allele frequency (MAF) <0.01, Hardy-Weinberg equilibrium test P-values (P_{HWE}) <1e-06 or call rate <0.99 in either cases or controls. After stringent quality control assessment, five samples were excluded from the analysis due to low call rate and a total of 794,090 SNPs with a mean call rate of 0.9994 for the remaining 603 cases and 583 controls were included in the study.

Genome-wide association analysis was performed using the Cochran–Armitage trend test with PLINK v1.07 [20] and the genomic inflation factor (λ) of 1.031 was used to correct for the degree of inflation [12]. Gene-wide association analyses were conducted with the VEGAS software [VErsatile Gene-Based Association Study; <http://gump.qimr.edu.au/VEGAS/>], which combines the effect of all SNPs in a gene locus and corrects for linkage disequilibrium (LD) [21]. Regions were defined using VEGAS default option as ± 50 kb upstream and downstream from each gene locus (UCSC Genome Browser; NCBI36/hg18 assembly), and the HapMap CEU population was used to estimate patterns of LD for each gene. Two different strategies were followed for gene-wide analyses by (i) considering all SNPs that mapped within a gene locus and (ii) restricting the analysis to the 10% most significant SNPs from each gene locus. Multiple-testing adjustment was addressed by the Bonferroni correction, and the significance threshold was set at $P\text{-value} < 1.4e-06$, taking into account 17,787 autosomal genes and the two gene-wise strategies ($0.05/(17,787*2)$). Positive signals surpassing a follow-up threshold of $P\text{-value} < 1e-03$ were tested in an independent dataset of 2,064 ADHD trios, 896 ADHD cases and 2,455 controls, following the same strategy described for the discovery sample [7, 22].

Gene-Set and Pathway Analysis

Gene-set and pathway analyses were restricted to genes surpassing a follow-up significance threshold set at $P\text{-value} < 1e-03$ in the gene-wide analyses when either all SNPs or the 10% most significant SNPs in gene locus were considered. The definition of the follow-up threshold was based on previous evidence supporting that VEGAS software provides an accurate performance for genes with $P\text{-value} < 1e-03$, offering a sizeable sensitivity, with less than 1% false positives and specificities ranging from 98% to 100%, while being able to distinguish between multiple independent causal loci and multiple signals due to linkage disequilibrium [23].

The gene-set analyses were performed with MAGMA software [Generalized Gene-Set Analysis of GWAS Data; <http://ctg.cncr.nl/software/magma>] [24], a statistical method for analyzing multiple genetic variants simultaneously to determine their joint effect while correcting for LD (gene-wide), and subsequently, assembling individual genes into groups of genes sharing biological or functional characteristics (gene-set). Multiple-testing correction was assessed by 10,000 permutations as implemented in the MAGMA software and the significance threshold was set at adjusted $P\text{-value} = 0.05$.

Functional and pathway enrichment analyses were conducted with IPA software [Ingenuity Pathway Analysis; Ingenuity Systems®, Redwood City, California, USA; <http://www.ingenuity.com>]. Fisher's exact test was used to calculate P-values, based on the number of genes/molecules that map to a biological function, disease, pathway, or network. A Benjamini-Hochberg's (BH) threshold of 0.05 was applied for multiple comparison correction in the functional, disease and pathway enrichment analyses. Gene networks were considered of relevance when the network score ($P\text{-score} = -\log_{10}(P\text{-value})$) was over 8 ($P\text{-value} < 1e-08$) [25-26].

Gene expression analysis in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with microarrays

Expression levels of genes identified in the gene-wide study (follow-up $P\text{-value}$ threshold $< 1e-03$) were tested in PBMCs of 45 medication-naive adults with a new clinical diagnosis of ADHD (69% male; mean age=38 years (SD=9.9)) and 39 healthy unrelated controls (60% males, mean age=35 years (SD=12.1)).

Briefly, PBMCs were isolated using Ficoll density gradient method, and total RNA was extracted using Qiazol Lysis reagent and the RNAeasy Midi kit [Qiagen, Hilden, Germany]. The quality of the samples was assayed by 2100 Bioanalyzer [Agilent Technologies Inc. Santa Clara, California, USA]. RNA was reverse transcribed using the Ambion WT Expression Kit [Life technologies, Massachusetts, USA]. The cRNA was subsequently fragmented, labelled and hybridized with the GeneChip WT Terminal Labeling

and Hybridization Kit to the Genechip Human Gene 1.1 ST 96-Array plate [Affymetrix, Santa Clara, California, USA]. The experiment was performed in 9 different amplification rounds, introducing a batch factor that was taken into consideration in the following statistical analyses. The array processing and data generation were assessed using the Gene Titan Affymetrix microarray platform. Background correction, normalization and summarization of probes values was performed using the Robust Multichip Average (RMA) algorithm implemented in the *Oligo R* library [27]. Expression patterns for genes of interest in ADHD subjects and controls were contrasted using the *LIMMA R* library [28], including batch and gender as covariates. Bonferroni correction was applied and the significance threshold was set at $P\text{-value}=1.5e-03$, taking into account the 33 genes displaying P -values below the follow-up threshold in the gene-wide analyses and with microarray data available (0.05/33).

Validation of gene expression differences with reverse transcription real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Validation of gene expression differences was performed on genes showing tentative evidence for differential expression in the microarray analysis, which included *MAB21L2*, *STXBP3* and *RNF122*. Gene expression validation assays were conducted with reverse transcription real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) in the same clinical sample of 45 ADHD cases and 39 controls. First, 2 μ g of total RNA was reverse transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit according to manufacturer's protocol in a final reaction volume of 20 μ L [Applied Biosystems; Foster City, California, USA]. Following, RT-qPCRs were run in triplicate using 2 μ L of cDNA, 2 μ L of RNase free water, 5 μ L of TaqMan® Gene Expression Master Mix and 1 μ L of TaqMan® Gene Expression Assay, in a final reaction volume of 10 μ L [Applied Biosystems; Foster City, California, USA]. Reactions were measured in an Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR system using the default thermal cycling conditions specified by the manufacturer [Applied Biosystems; Foster City, California, USA]. The threshold cycle (C_T) was defined as the fractional cycle number at which the fluorescence exceeded the threshold of 0.2. The relative quantification of mRNA expression was calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [29], considering only those samples showing standard deviations values ≤ 0.3 among triplicates and the *GADD45A* gene as an endogenous control, after checking its stability and linearity across all samples. Using the *Stats R* package [<https://www.R-project.org/>] [30], generalized linear models (GLM) were applied to compare gene expression levels between ADHD cases and controls, including gender as covariate in the fitted model. The statistical test was one-sided and the Bonferroni correction was applied

for multiple-testing control, setting the statistical significance threshold at $P\text{-value} < 0.017$ when taking into account three genes ($0.05/3$).

Imputation, *cis*-expression Quantitative Trait Loci (*cis*-eQTL) Analyses and Prediction of Functional Effects

To better delineate the involvement of *RNF122* in ADHD and to detect potential functional variants, markers at this locus were imputed in the original dataset of 603 subjects with ADHD and 583 healthy controls. Pre-imputation quality control of the GWAS dataset at the individual and SNP level was implemented in accordance to the QC module instructions from the Ricopili pipeline considering default settings [<https://sites.google.com/a/broadinstitute.org/ricopili/>]. Screening for cryptic relatedness and population stratification was performed by Principal Components Analysis (PCA). Markers at the *RNF122* gene region plus 10kb upstream and 5kb downstream from the locus (chr8:33519815-33554185; NCBI36/hg18) were imputed in the GWAS sample through the pre-phasing and imputation strategies implemented by SHAPEIT and IMPUTE2, respectively [31-32], using the Ricopili pipeline [<https://sites.google.com/a/broadinstitute.org/ricopili/>] and data from the 1000 Genomes Project as the reference panel [<http://www.1000genomes.org/>] [33]. After filtering SNPs with $MAF < 0.01$ and low imputation quality ($r < 0.4$), 138 SNPs were finally considered. We performed the association analysis using logistic regression models with the PLINK v1.07 software [20] and multiple-testing was addressed by the Bonferroni correction, setting the significance threshold at $P\text{-value} = 3.6e-04$ when considering 138 imputed SNPs in the *RNF122* locus ($0.05/138$). Since this approach may be too conservative, alternative multiple-testing control was assessed using the Single Nucleotide Polymorphism Spectral Decomposition (SNPSpD) software [<http://neurogenetics.qimrberghofer.edu.au/SNPSpDlite/>] [34], which takes into account patterns of LD. Once top signals were identified, in order to uncover additional independent effects and to assess evidence for multi-risk loci in each region, further conditioned analysis was performed with PLINK v1.07 software [20]. To condition the logistic regression analysis on a specific SNP, we tested all markers again but adding the allelic dosage for the conditioned SNP as a covariate [20].

The *cis*-eQTL analyses were conducted using genotype and expression data from a series of neuropathologically and neuropsychiatrically normal human brain samples from GSE8919 [35] and GSE30272 [36] datasets, available at the Gene Expression Omnibus site [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>]. Genotype data from both studies were imputed following the methodology described above. Expression levels of the *RNF122* transcript NM_024787.2 were available

for 62 cortical samples of European ancestry in the GSE8919 dataset (probe ID: GI_38045930-S) and for 94 prefrontal cortex samples of Caucasian origin in the GSE30272 dataset (probe ID:HEEBO-062-HCC62D14) [35-36]. Rank-based inverse normal transformation of expression data was applied using *Stats* R package [<https://www.R-project.org/>] [30] and additive linear regression models were fitted for eQTL mapping using PLINK v1.07 software [20], considering covariates showing suggestive association with the outcome (P -value <0.2 ; gender, age_at_death and transcripts_detected_rate24354 (average transcript detection rate for sample, out of all 24354 probes) for GSE8919 and sv2 (surrogate variable 2) for GSE30272 datasets). Bonferroni correction was applied for multiple-testing and the significance threshold was set at P -value=4.3e-04 for the GSE8919 dataset and at P -value=3.8e-04 for the GSE30272 dataset, considering the number of available SNPs.

Potential functional effects of the independent risk alleles associated with ADHD were predicted using the SNPinfo, ESEfinder, and RESCUE_ESE web softwares [37-39].

RESULTS

Gene-Wide and Gene-Set Analysis

After individual and SNP-based standard quality control filtering, 794,090 autosomal SNPs in 603 adult ADHD cases and 583 healthy controls were included in the GWAS. The quantile–quantile plot showed no departure from the expected P -values distribution, with a genomic control inflation factor of $\lambda=1.031$ [12].

The gene-wide association analysis revealed 20 genes surpassing the follow-up significance threshold (P -value $<1e-03$) when considering all SNPs located within a gene locus, with *CTAGE5* (P -value=3.0e-06) and *FBXO33* (P -value=4.0e-06) as the most associated genes (Table 1). Twenty additional genes were found associated with persistent ADHD when we considered the 10% most significant SNPs of each gene locus, with *KCNG4* (P -value=1.0e-04) and *TAF1C* (P -value=1.9e-04) as top signals (Table 1). After Bonferroni correction, only *CTAGE5* remained associated with ADHD. Consistently, the gene-set analysis revealed that both gene-sets were significantly associated with persistent ADHD after correcting for multiple (gene-set corrected P -value=1e-03 when considering all SNPs within a gene locus and gene-set corrected P -value $<1e-03$ when considering the top 10% SNPs in each locus) (Table 1), although no overlap was detected between them. However, some genes highlighted in the previous single-marker

GWAS were found among top genes surpassing the follow-up significance threshold (P -value $<1e-03$) in the present gene-wide analyses (*FBXO33*, *PEX19*, *COPA* and *KCNG4*) [12].

We further tested the 40 genes surpassing the follow-up threshold of P -value $<1e03$ in an independent dataset from the first large-scale meta-analysis of ADHD GWAS, consisting of 2,064 ADHD trios, 896 ADHD cases and 2,455 controls from the Psychiatric Genetics Consortium [7, 22]. No signal was associated with ADHD after Bonferroni correction. Nominal signals, however, were found for *FBXO33* (P -value=0,047 when considering all SNPs in the gene locus and P -value=0.01 when considering the top 10% SNPs) and *C15orf53* (P -value=0,036 when considering the top 10% SNPs in the gene locus) (see Supplementary Table S1).

Table 1. Gene-wide and gene-set P -values considering all SNPs or the 10% most significant SNPs in gene locus using VEGAS and MAGMA softwares. Genes displaying P -value $<1e-03$ are shown.

Chr	Gene	Number of SNPs	Start Position	Stop Position	Gene-wide P-value	Loci associated with neuropsychiatric or neurological disorders
Full set of SNPs						
Global gene-set P-value= 2.2e-4 ($P_{corrected}=1.0e-03$)						
14	<i>CTAGE5</i>	39	38754226	38940148	0**	Antidepressant efficacy in major depressive disorder, mild intellectual disability, and traits of inattention and hyperactivity [65-61]
14	<i>FBXO33</i>	17	38886709	39021371	3.00e-06	Autism spectrum disorders, attention deficit, hyperactivity and mild mental retardation [12, 59-64]
14	<i>MIA2</i>	26	38722875	38842326	4.00e-06	Mild intellectual disability, and traits of inattention and hyperactivity [61]
1	<i>PEX19</i>	10	158463225	158571555	3.40e-05	Major depressive disorder and ADHD [12, 67]
1	<i>COPA</i>	32	158475000	158629978	4.40e-05	Bipolar Disorder and ADHD [12, 68]
14	<i>PNN</i>	24	38664137	38772173	6.70e-05	Mild intellectual disability, and traits of inattention and hyperactivity [61]
1	<i>WDR42A</i>	34	158402128	158548603	8.80e-05	-
1	<i>NCSTN</i>	32	158529686	158645366	1.76e-04	Alzheimer's Disease and Schizophrenia [69-70]
1	<i>MAST2</i>	34	45991871	46324383	3.35e-04	-
1	<i>CASQ1</i>	46	158376988	158488300	3.56e-04	-
15	<i>CALML4</i>	14	66220096	66335502	4.50e-04	Major depressive disorder and stress [71-72]
1	<i>ZP4</i>	45	236062332	236170558	5.44e-04	ADHD [73-74]
1	<i>IPP</i>	22	45886993	46034720	6.75e-04	Cocaine dependence [75]
1	<i>TMEM69</i>	19	45876433	45982695	7.12e-04	Amphetamine effects and aggressiveness [76-77]
4	<i>MAB21L2</i>	15	151672752	151775295	7.60e-04	Autism spectrum disorders, and mild intellectual disability [78-80]
1	<i>GPBP1L1</i>	29	45815567	45949398	7.75e-04	Autism spectrum disorders, and traits of inattention in Tourette syndrome [81-82]
1	<i>STXBP3</i>	69	109040807	109203671	8.53e-04	-
13	<i>MLNR</i>	16	48642474	48744514	9.24e-04	-
2	<i>NLRC4</i>	26	32253021	32394305	9.36e-04	Schizophrenia, and bipolar disorder [83-84]
1	<i>PEA15</i>	37	158391750	158501786	9.42e-04	Major depressive disorder [85]

Chr	Gene	Number of SNPs	Start Position	Stop Position	Gene-wide P-value	Loci associated with neuropsychiatric or neurological disorders
Top 10% of SNPs						
Global gene-set P-value=1.12e-10 (P_{corrected}<1.0e-03)						
16	<i>KCNG4</i>	118	82763323	82880857	1.00e-04	Alcohol consumption, and bipolar disorder in Amish population [86-87]
16	<i>TAF1C</i>	86	82718961	82828163	1.90e-04	Autism and schizophrenia [88-90]
22	<i>NCF4</i>	48	35536975	35654005	2.10e-04	Schizophrenia [91]
22	<i>CSF2RB</i>	61	35589620	35716425	3.60e-04	Schizophrenia, major depressive disorder and bipolar disorder [92-94]
17	<i>AKAP10</i>	18	19699341	19871721	3.80e-04	Autism spectrum disorders, schizophrenia and bipolar disorder [95-97]
1	<i>ATP1A1</i>	23	116667358	116798919	4.10e-04	Major depressive disorder, autism spectrum disorders, anxiety and bipolar disorder [98-101]
8	<i>DUSP26</i>	21	33518392	33626981	5.10e-04	Antidepressant Efficacy in Major Depressive Disorder [63]
12	<i>RAP1B</i>	18	67240918	67390641	5.80e-04	Autism spectrum disorders [102-103]
19	<i>AKAP8</i>	9	15275334	15401603	6.10e-04	Autism spectrum disorders [95, 104]
20	<i>RIN2</i>	113	19768209	19981100	6.40e-04	Bipolar disorder, schizophrenia and stress-induced changes [105-107]
2	<i>SPAST</i>	29	32092183	32286210	6.80e-04	Autism spectrum disorders, and cognitive deficiency [109-110]
7	<i>CCL26</i>	34	75186777	75307000	7.10e-04	Schizophrenia, and bipolar disorder [111-112]
20	<i>NAT5</i>	59	19895936	20012269	7.60e-04	Autism spectrum disorders and comorbid anxiety [113]
8	<i>RNF122</i>	31	33474814	33594185	7.70e-04	Antidepressant efficacy in major depressive disorder [65]
15	<i>C15orf53</i>	66	36726090	36829531	7.90e-04	Bipolar disorder, and alcohol dependence [108, 114]
7	<i>GPR146</i>	34	1013666	1115423	8.90e-04	Autism spectrum disorders [115-116]
8	<i>C8orf41</i>	25	33425777	33540245	9.20e-04	Antidepressant efficacy in major depressive disorder, and cognitive deficiency [65, 117-118]
2	<i>MEMO1</i>	25	31896397	32139202	9.20e-04	-
12	<i>ALX1</i>	16	84148166	84269692	9.30e-04	Autism spectrum disorders [119-120]
7	<i>GPBR1</i>	36	1042968	1149977	9.40e-04	Anxiety and stress, bipolar disorder, and antipsychotic treatment for schizophrenia [121-124]

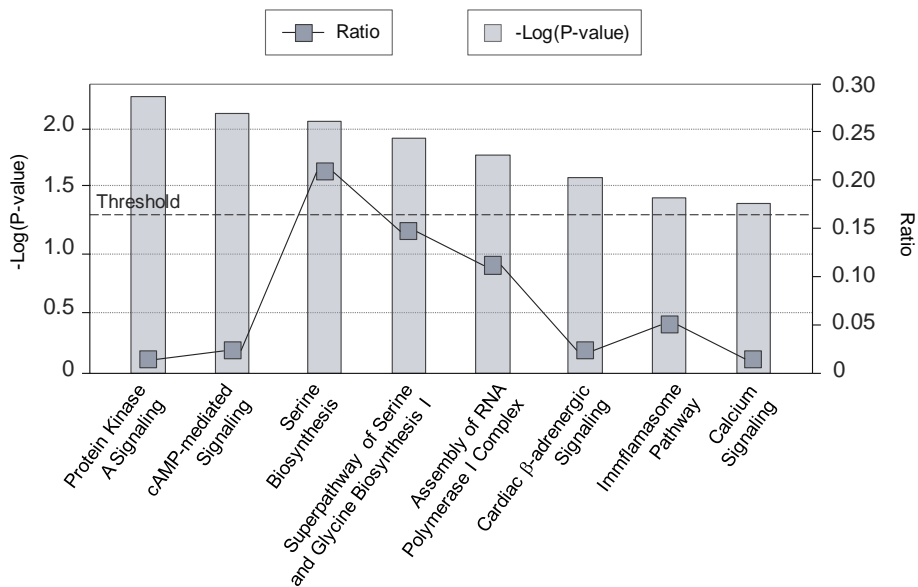
Start and stop positions include default flanking regions of ± 50 Kb from 5' and 3' UTRs of each gene, defined by default by VEGAS software (<http://gump.qimr.edu.au/VEGAS/>), and are based on UCSC annotation, build NCBI36/hg18 (Mar. 2006).

*An empirical Pvalue of 0 (from 10^6 simulations) can be interpreted as $Pvalue < 10^{-6}$, which exceeds a Bonferroni-corrected threshold set at $Pvalue < 2.8e-06$ ($\sim 0.05/17,787$).

Functional and Pathway Analysis

Although none of them survived BH multiple-testing correction, enrichment for eight canonical pathways was detected when the 40 genes from the two gene-sets identified in the gene-wide association analysis were considered jointly, including protein kinase A (PKA) and cAMP-mediated signaling (P -value=5.75e-03 and P -value=7.94e-03, respectively), serine biosynthesis and superpathway of serine and glycine biosynthesis (P -value= 9.33e-03 and P -value=1.29e-02, respectively), assembly of RNA polymerase I complex (P -value=1.66e-02), cardiac adrenergic signaling (P -value=2.57e-02), inflammasome pathway (P -value=3.80e-02) and calcium signaling (P -value=4.27e-02) (Figure 1).

Figure 1. Enriched canonical pathways ($P < 0.05$) considering 40 genes from the gene-wise analyses surpassing follow-up significance threshold ($P < 10e-03$). The $-\log(P\text{-value})$ from the Fisher's exact test for each enriched category is indicated by grey bars. The ratio indicates the number of genes tested that map to the canonical pathway divided by the total number of genes that map to that pathway, and is represented by black squares.



Among the top functions and diseases, most enriched categories were mainly related to organismal and embryonic development ($P\text{-value}=2.58e-04 - 4.00e-02$), cell-to-cell signaling and interaction ($P\text{-value}=3.96e-04 - 3.47e-02$) and cellular movement ($P\text{-value}=1.28e-03 - 3.60e-02$) (Table 2). In addition, several nervous system-related terms and psychological traits were also identified among enriched categories, such as relaxation of mice ($P\text{-value}=5.55e-03$), swelling of neurites ($P\text{-value}=7.40e-03$), axonal transport of vesicles ($P\text{-value}=9.24e-03$), abnormal morphology of nervous system ($P\text{-value}=1.10e-02$) or addiction behaviour ($P\text{-value}=4.36e-02$) (Table 3). Three relevant networks that included genes mainly related to cellular development, organization, function and maintenance, cell death and survival, and cell-to-cell signaling and interaction were generated (Table 4). The two most relevant networks were highly scored ($P\text{-score}=44$ and $P\text{-score}=26$, respectively) and included 18 (45%) and 12 (30%) out of the 40 genes considered for this analysis.

Table 2. Top-ten enriched super-categories from disease and functional enrichment analyses using IPA software, considering 40 genes identified in the gene-wide analyses surpassing follow-up significance threshold (P -value $<10e-03$).

Super-category	P-value	Molecules
Embryonic Development	2.58e-04 - 3.83e-02	<i>NCSTN, ALX1, CSF2RB, PNN, MAB21L2, PEA15</i>
Organismal Development	2.58e-04 - 4e-02	<i>NCSTN, GPER1, ALX1, COPA, ATP1A1, CSF2RB, AKAP8, RAP1B, MAB21L2, NLRC4, PEA15</i>
Tissue Development	2.58e-04 - 4.94e-02	<i>NCSTN, GPER1, ALX1, CSF2RB, RAP1B, IPP, MAB21L2</i>
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	3.96e-04 - 3.47e-02	<i>NCF4, CCL26, CSF2RB, STXB3, RAP1B</i>
Cellular Movement	1.28e-03 - 3.65e-02	<i>NCF4, CCL26, GPER1, CSF2RB, RAP1B, NLRC4</i>
Hematological System Development and Function	1.28e-03 - 4.89e-02	<i>CCL26, NCF4, NCSTN, CSF2RB, RAP1B, NLRC4</i>
Immune Cell Trafficking	1.28e-03 - 3.65e-02	<i>NCF4, CCL26, CSF2RB, RAP1B, NLRC4</i>
DNA Replication, Recombination, and Repair	1.51e-03 - 2.39e-02	<i>GPER1, AKAP8, PEA15</i>
Cardiovascular System Development and Function	1.85e-03 - 2.39e-02	<i>AKAP10, GPER1, ATP1A1, CSF2RB, RAP1B</i>
Cell Cycle	1.85e-03 - 3.65e-02	<i>PEX19, PNN, NLRC4, PEA15</i>

Table 3. Significant nervous system-related categories identified in the disease and functional enrichment analyses using IPA software, considering 40 genes identified in the gene-wide analyses surpassing follow-up significance threshold (P -value $<10e-03$).

Super-Categories	Diseases or Functions	P-value	Molecules
Hereditary Disorder, Neurological Disease, Organismal Injury and Abnormalities	autosomal dominant spastic paraplegia type 4	1.85e-03	<i>SPAST</i>
Developmental Disorder, Hereditary Disorder, Neurological Disease, Organismal Injury and Abnormalities	autosomal recessive mental retardation type 39	1.85e-03	<i>TTI2</i>
Developmental Disorder, Neurological Disease, Organismal Injury and Abnormalities	meroanencephaly	1.85e-03	<i>ALX1</i>
Organismal Development	relaxation of mice	5.55e-03	<i>ATP1A1</i>
Connective Tissue Disorders, Developmental Disorder, Neurological Disease, Skeletal and Muscular Disorders	acrania	7.40e-03	<i>ALX1</i>
Cell Morphology, Cellular Assembly and Organization, Cellular Development, Cellular Function and Maintenance, Cellular Growth and Proliferation, Neurological Disease, Organismal Injury and Abnormalities	swelling of neurites	7.40e-03	<i>SPAST</i>
Nervous System Development and Function	antinociception of spinal cord	9.24e-03	<i>GPER1</i>
Cellular Assembly and Organization, Cellular Function and Maintenance, Nervous System Development and Function	axonal transport of vesicles	9.24e-03	<i>SPAST</i>
Nervous System Development and Function	abnormal morphology of nervous system	1.10e-02	<i>ALX1, MAB21L2, PEA15, RAP1B, SPAST, STXB3</i>
Connective Tissue Disorders, Developmental Disorder, Organismal Development, Skeletal and Muscular Disorders	clefing of face	1.29e-02	<i>ALX1</i>
Embryonic Development, Nervous System Development and Function, Organismal Development, Tissue Morphology	abnormal morphology of neural crest	1.47e-02	<i>NCSTN</i>
Cell Morphology, Nervous System Development and Function, Tissue Morphology	abnormal morphology of neurites	3.92e-02	<i>RAP1B, SPAST</i>
Connective Tissue Development and Function, Organ Morphology, Organismal Development, Skeletal and Muscular System Development and Function, Tissue Development	abnormal morphology of supraoccipital bone	4.00e-02	<i>ALX1</i>
Behavior	addiction behaviour	4.36e-02	<i>ATP1A1</i>
Cell Morphology, Nervous System Development and Function, Neurological Disease, Tissue Morphology	loss of axons	4.89e-02	<i>RAP1B</i>

Table 4. Significant generated networks (P-score=8) using IPA software, considering 40 genes identified in the gene-wide analyses surpassing follow-up significance threshold (P-value<10e-03). Focus molecules from the follow-up gene-set are shown in bold.

Molecules in Network	P-score*	Focus Molecules	Top Diseases and Functions
<i>ABL1, AKAP8, AKAP10, Akt, ATP1A1, C1QBP, caspase, CASQ1, CCL26, COPA, CSF2RB, DDX3X, EMILIN1, ERK, ERK1/2, Gpcr, GPER1, GPR146, Insulin, MAST2, MEMO1, MLNR, NCF4, NCSTN, NFkB (complex), NLRC4, P38 MAPK, PEA15, PI3K (complex), Pka, Pkc(s), RAP1B, STXBP3, TARDBP, TRAF6</i>	44	18	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Cellular Development, Hematological System Development and Function
<i>AES, APP, C3orf33, CEP57, Collagen type VII, CTAGE5, DCAF8, DGCR6/LOC102724770, DUSP26, ELAVL1, EMILIN1, FAM20B, FBXO33, GPBP1L1, HIGD2A, HINT3, HSP90AB1, MAB21L2, MAPK3, MMP3, PEX19, PEX26, PLD6, PNN, RAF1, RBX1, RIN2, RNF122, SELT, SPAST, TARDBP, TMTC4, TRAF6, TTI2, YBX1</i>	26	12	Cellular Assembly and Organization, Cellular Compromise, Cellular Function and Maintenance
<i>ABL1, Actin, ALB, ALX1, BZW2, CALML4, Cdc2, CDC25A, CREB1, CUL1, CYBA, Cyclin B, EGLN1, EPO, GABBR1, GDF15, HNF1A, IKKB, IPP, IRF3, KHDRBS1, KRT8, KRT18, LANCL1, MIA2, mir-296, MYB, MYBL2, MYO5B, NAA20, TAF1C, TARDBP, TGFB1, TRAF6, YBX1</i>	11	6	Cell Death and Survival, Digestive System Development and Function, Hepatic System Development and Function

* P-score=-log₁₀(P-value).

Gene expression analysis in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

Expression levels of the 40 genes in the two gene-sets identified in the gene-wide association study were explored in microarray data from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 45 adults with ADHD and 39 healthy controls. No data was available for two of them (*WDR42A* and *NAT5*) and another five were excluded because the corresponding probes matched to multiple genes (*COPA*, *TMEM69*, *TAF1C*, *MEMO1*, *C8orf41*). Although no significant expression differences were identified after Bonferroni correction, tentative evidence for overexpression was detected in ADHD subjects for *STXBP3* (P-value=1.9e-03; log fold change=0.115) and *RNF122* (P-value=0.045; log fold change=0.111) and decreased expression for *MAB21L2* (P-value=0.036; log fold change=-0.77) when compared to controls (Table 5). Differences in *RNF122*, *STXBP3* and *MAB21L2* expression levels were subsequently tested by RT-qPCR and evidence for significant overexpression was confirmed for *RNF122* (but not for *STXBP3* or *MAB21L2*) after controlling for multiple testing using the Bonferroni correction (P-value=3.04e-03; OR=4.13 [2.46-5.81]); Table 6).

Table 5. Differentially expressed genes in peripheral blood mononucleated cells (PBMCs) of 45 pharmacologically-naive ADHD subjects and 40 healthy unrelated controls in the microarray analysis.

Probe ID	Log-Fold change	P-value	Gene Symbol	Description
8150186	0.111	0.048	<i>RNF122</i>	Localizes to the endoplasmic reticulum and golgi apparatus and may be associated with cell viability by inducing necrosis and apoptosis. Mediates protein-protein and protein-DNA interactions, and has been identified as a new E3 ubiquitin ligase that can ubiquitinate itself and undergo degradation in a RING finger-and proteasome-dependent manner [125].
7903541	0.115	2.3e-03	<i>STXBP3</i>	Plays an integral role in vesicle transport through their interaction with SNAREs and could play a positive regulatory role in SNARE assembly [126].
8097773	-0.77	0.034	<i>MAB21L2</i>	Required for several aspects of embryonic development including normal development of the eye. May be involved in neural development [127].

Table 6. Validation of *MAB21L2*, *STXBP3* and *RNF122* gene expression differences between pharmacologically-naive ADHD subjects and healthy unrelated controls by RT-qPCR. Statistically significant P-values after applying a Bonferroni threshold of $P\text{-value} < 0.017$, when taking into account three genes ($0.05/3$), are shown in bold.

Assay information of target and control genes							
Gene name	Gene Symbol	Gene ID	Location	Assay ID	Amplicon Size		
Housekeeping gene							
growth arrest and DNA damage inducible alpha	<i>GADD45A</i>	1647	1p31.2	Hs00169255_m1	123		
Target genes							
mab-21-like 2	<i>MAB21L2</i>	10586	4q31	Hs00740710_s1	93		
syntaxin binding protein 3	<i>STXBP3</i>	6814	1p13.3	HS01029364_m1	149		
ring finger protein 122	<i>RNF122</i>	79845	8p12	Hs00227141	99		
Results from RT-qPCR validation of <i>MAB21L2</i> , <i>STXBP3</i> and <i>RNF122</i> genes							
Target gene	Control gene	ODDS Ratio	Standard Error	Z-value	P-value	Number of controls	Number of cases
<i>RNF122</i>	<i>GADD45A</i>	4.133	0.517	2.744	3.04e-03	34	42
<i>STXBP3</i>	<i>GADD45A</i>	2.361	0.521	1.648	0.049	40	44
<i>MAB21L2</i>	<i>GADD45A</i>	0.866	0.701	-0.206	0.419	35	25

Cis-expression Quantitative Trait Loci (cis-eQTL) Analyses and Prediction of Functional Effects

To better define the role of *RNF122* in ADHD and to detect potential functional variants, we imputed markers at this locus in the original dataset of 603 subjects with ADHD and 583 healthy controls and

found 47 out of 138 SNPs nominally associated with ADHD. Although none of them exceeded the conservative Bonferroni-corrected threshold, three surpassed the SNPSpD multiple-testing correction (rs3735951, rs9297208 and rs9297209) (See Supplementary Figure S1). Suggestive evidence for association was detected along the entire gene, with the top signal at the genotyped variant rs3735951, located in exon 2, being the allele T the risk allele (P-value=8.18e-04; OR=1.37[1.14-1.65]) (See Supplementary Figure S1). After conditional analysis, no evidence for additional independent effects was detected along the gene, being the entire association of this locus explained by the rs3735951 marker (See Supplementary Table S2). Although we did not find evidence for rs3735951 acting as *cis*-eQTL in preexisting datasets of cortical gene expression (GSE8919 and GSE30272) [35-36], that could explain the *RNF122* expression differences identified in ADHD (See Supplementary Table S3), functional prediction revealed that rs3735951 may lie within a partially overlapped exonic splicing enhancer (ESE) site and an exonic splicing silencer (ESS) site (See Supplementary Table S4). While the rs3735951T risk allele may create an ESE site potentially targeted by the spliceosome factors SRSF2 and SRSF5, the rs3735951C allele may generate an ESS site (See Supplementary Table S4).

DISCUSSION

With the aim of uncovering new underlying genes involved in persistent ADHD and providing additional evidence for the contribution of previously identified genes, we performed gene-wide and pathway enrichment analyses in a pre-existing GWAS dataset of adult ADHD followed by gene expression profiling. Our results provide preliminary evidence for genetic association between ADHD and the *RNF122* gene and abnormal *RNF122* expression levels in PBMCs of medication-naive ADHD subjects. These findings highlight *RNF122* as a strong candidate for ADHD.

RNF122 (Ring Finger Protein 122) is an E3 ubiquitin ligase involved in the proteasome-mediated processing, trafficking, and degradation of proteins that acts as an essential mediator of the substrate specificity of ubiquitin ligation [41]. This finding is in line with previous genome-wide analyses supporting the involvement of genes related to the ubiquitination machinery in the genetic susceptibility to ADHD or attention function, including the genes *FBXO33* and *PARK2* genes, which also encode for components of the E3 ubiquitin-protein ligase complex [12, 42]. Interestingly, the second most significant network identified in the present study revealed an indirect connection between *RNF122* and *FBXO33*, and included other best hits such as *MAB21L2* or *PEX19* (Table 1 and 3). The ubiquitin-proteasome pathway controls wide-ranging functions in the central nervous system (CNS), including fine-tuning of synaptic

connections during development and synaptic plasticity in the adult organism, and has been identified as a well-founded pathway for other psychiatric or neurological conditions, including bipolar disorder, schizophrenia, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease, intellectual disability or autism spectrum disorder [43-51]. In line with these findings, the identification of "Protein Kinase A Signaling" and "cAMP-mediated Signaling" as the two most significantly enriched canonical pathways may also support the role of the identified genes in adult synaptic plasticity mediated by the ubiquitin-proteasome system since ubiquitination, degradation and subsequent removal of regulatory subunits of protein Kinase A in response to cAMP stimulation induce neuronal differentiation and activity, as well as synaptic plasticity (Figure 1) [43-44, 52-53].

The overexpression of *RNF122* that we found in persistent ADHD is in agreement with previous studies reporting increased expression levels of E3 ubiquitin ligases in neuropsychiatric disorders [51, 54]. Given its role in synaptic surface-protein turnover and in the regulation of the number of scaffolding proteins and neurotransmitter receptors, increased ubiquitin ligation and subsequent enhanced protein removal may compromise neuronal functioning [43, 55-56]. Although its consequences in the remodelling of the synaptic density should be further investigated, enhanced ubiquitin-proteasome pathway activity may entail downregulation of synaptic receptors, such as gamma-aminobutyric acid (GABA), α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA), N-methyl-d-aspartate (NMDA) or nicotinic acetylcholine (nACh) receptors; and eventually lead to the neuropathological mechanisms that likely underlie neuropsychiatric disorders [51, 54, 56-60].

We also identified a significant association between *CTAGE5* and persistent ADHD after Bonferroni correction. *CTAGE5*, together with other top hits identified in the gene-wise analyses, namely *FBXO33*, *MIA2* and *PNN*, lies within a deletion on chromosome 14 identified in three subjects with different neurologic and/or psychiatric traits, such as mild mental retardation, severe learning difficulties, motor alterations or ADHD symptoms [61]. *FBXO33* gene encodes a member of the F-box protein family which acts as a component of an E3 ubiquitin-protein ligase complex and is involved in targeting substrates for proteasomal degradation, while *CTAGE5* and *MIA2* genes are both involved in the traffic of large cargos from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus, a process that involves ubiquitination [62]. Thus, together with the involvement of *RNF122* in ADHD, these findings highlight the need for further studies exploring in depth the potential role of the ubiquitin proteasome-pathway in the susceptibility of ADHD.

Additionally, nominal signals were identified for *C15orf53* and *FBXO33* in both the discovery and the replication datasets. Interestingly, *C15orf53* has previously been associated with bipolar disorder and

alcohol dependence, and *FBXO33*, which may be involved in autism spectrum disorders, was highlighted in the previous SNP-based GWAS that we performed in the same discovery dataset and provides additional evidence supporting the ubiquitination machinery as a new mechanism for ADHD [7, 22].

Our study should be viewed in light of several methodological considerations:

First, we attempted to overcome SNP-based GWAS limitations by using a gene-wide approach, a promising complement to GWAS since it considers the combined effects of all genetic variants within a locus and might be more powerful than traditional SNP-based strategies [9]. Our modest sample size and the anticipated small effect of common polymorphisms in complex traits, however, may have prevented us from detecting additional signals, apart from *CTAGE5*, exceeding the conservative Bonferroni correction. Additionally, although controls were screened retrospectively for ADHD symptoms, no specific scale or structured interview was used to discard the presence of other psychiatric disorders and, therefore, certain degree of heterogeneity in the control sample may exist and might influence our results.

Second, the conditional analysis highlighted rs3735951 as top-ranked variant at the *RNF122* locus and eliminated evidence for association for other SNPs within the region. This sequence variant did not tag any eQTL for *RNF122* in human brain samples from two available pre-existing data sets [35-36], but lies within potential exonic splicing regulatory elements. Specifically, the rs3735951T risk allele is predicted to create an exonic splicing enhancer (ESE), potentially targeted by *SRSF2* and *SRSF5* spliceosome factors, which could result in alternative splicing of the *RNF122* transcript and, thus, modulate substrate specificity or ligation function (Supplementary Table S4) [37-39]. Given that rs3735951 lies within a LD block that spans the entire gene, however, we cannot discard additional relevant variants within the locus exerting functional effects.

Third, while we identified genes displaying biologically interesting functions and pathways pointing to the ubiquitin-proteasome pathway as a promising system, no overlap was observed between our gene-wide results and previous findings in ADHD through either individual GWAS or meta-analysis [2-4, 8]. The replication attempt in an independent sample, however, yielded preliminary evidence for nominal association of ADHD with *FBXO33* and *C15orf53*. Heterogeneity between populations and differences in study design or in the proportion of persistent ADHD between datasets may account for discordant results across studies, making it difficult to establish direct comparisons between reports. For this reason, further replication of the gene-wide and gene expression results in independent cohorts are needed to confirm these associations and to estimate the magnitude of their effect.

Fourth, aberrant *RNF122* expression levels were detected in PBMCs of ADHD subjects, naive for pharmacological treatment. Transcriptome analysis in peripheral blood has become an increasingly useful tool in the research for biomarkers in multiple medical fields, including psychiatric disorders, given their great deal of potential for non-invasive screening, diagnosis and prognosis, or for differentiation of biological endophenotypes, development of targeted therapies and anticipation of clinical response or adverse effects [63]. Although whole blood shares substantial transcriptome similarities with different CNS tissues so as to use peripheral expression profiles as a surrogate for gene expression in the CNS, further evidence in brain tissues is required to assert the role of *RNF122* in the pathophysiology of ADHD [64].

In conclusion, we performed gene-wide and pathway enrichment analyses using data from a pre-existing GWAS dataset of persistent ADHD and provided tentative evidence for the involvement of the *CTAGE5* and *RNF122* genes in the susceptibility of the disorder. We also detected overexpression of *RNF122* gene in PBMCs of adult ADHD patients, placing this gene as a promising candidate for the disorder. The evidence provided by our findings point to the ubiquitin-proteasome system as a well-founded pathway involved in the etiology of ADHD. Further collaborative efforts are required to disentangle the exact molecular mechanisms by which *CTAGE5*, *RNF122*, and the ubiquitin-proteasome system may contribute to the pathophysiology of ADHD and other neuropsychiatric disorders.

REFERENCES

1. Faraone, S. V. *et al.* Attention-deficit/hyperactivity disorder. *Nat Rev Dis Primers.* **1**, 15020; 10.1038/nrdp.2015.20 (2015).
2. Gizer, I. R., Ficks, C. & Waldman, I. D. Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet.* **126**, 51-90 (2009).
3. Franke, B. *et al.* The genetics of attention deficit/hyperactivity disorder in adults, a review. *Mol Psychiatry.* **17**, 960-87 (2012).
4. Li, Z., Chang, S. H., Zhang, L. Y., Gao, L. & Wang, J. Molecular genetic studies of ADHD and its candidate genes: a review. *Psychiatry Res.* **219**, 10-24 (2014).
5. Thapar, A. & Cooper, M. Attention deficit hyperactivity disorder. *Lancet.* **387**, 1240-50 (2016).

6. Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Genetic relationship between five psychiatric disorders estimated from genome-wide SNPs. *Nat Genet.* **45**, 984-94 (2013).
7. Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis. *Lancet.* **381**, 1371-9 (2013).
8. Hawi, Z. *et al.* The molecular genetic architecture of attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry.* **20**, 289-97 (2015).
9. Wang, L., Jia, P., Wolfinger, R. D., Chen, X. & Zhao, Z. Gene set analysis of genome-wide association studies: methodological issues and perspectives. *Genomics.* **98**, 1-8 (2011).
10. Poelmans, G., Pauls, D. L., Buitelaar, J. K. & Franke, B. Integrated genome-wide association study findings: identification of a neurodevelopmental network for attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry.* **168**, 365-77 (2011).
11. Network and Pathway Analysis Subgroup of Psychiatric Genomics Consortium. Psychiatric genome-wide association study analyses implicate neuronal, immune and histone pathways. *Nat Neurosci.* **18**, 199-209 (2015).
12. Sánchez-Mora, C. *et al.* Case-control genome-wide association study of persistent attention-deficit hyperactivity disorder identifies FBXO33 as a novel susceptibility gene for the disorder. *Neuropsychopharmacology.* **40**, 915-26 (2015).
13. Epstein, J., Johnson, D. & Conners, K. *Adult ADHD Diagnostic Interview for DSM-IV.* (Multi-Health Systems, 1999).
14. Conners, C. K. The computerized continuous performance test. *Psychopharmacol Bull.* **21**, 891-892 (1985).
15. DuPaul, G., Power, T., Anastopoulos, A. & Reid, R. *ADHD Rating Scales, IV: Checklists, Norms, and Clinical Interpretation.* (Guilford Press, 1998).
16. Ward, M. F., Wender, P. H. & Reimherr, F. W. The Wender Utah Rating Scale: an aid in the retrospective diagnosis of childhood attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry.* **150**, 885-890 (1993).
17. NIMH. CGI Clinical Global Impression Scale. *Psychopharmacol Bull.* **21**, 839-844 (1985).
18. Sheehan, D. *The Anxiety Disease.* (Charles Scribner's Sons, 1983).

19. Ribases, M. *et al.* Exploration of 19 serotonergic candidate genes in adults and children with attention-deficit/hyperactivity disorder identifies association for 5HT2A, DDC and MAOB. *Mol Psychiatry*. **14**, 71-85 (2009).
20. Purcell, S. *et al.* PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*. **81**, 559-75 (2007).
21. Liu, J. Z. *et al.* A Versatile Gene-Based Test for Genome-wide Association Studies. *Am J Hum Genet*. **87**, 139-45 (2010).
22. Neale, B. M. *et al.* Meta-analysis of genome-wide association studies of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. **49**, 884-97 (2010).
23. Wojcik, G. L., Kao, W. H. & Duggal, P. Relative performance of gene- and pathway-level methods as secondary analyses for genome-wide association studies. *BMC Genet*. **16**, 34 (2015).
24. de Leeuw, C. A., Mooij, J. M., Heskes, T. & Posthuma, D. MAGMA: generalized gene-set analysis of GWAS data. *PLoS Comput Biol*. **11**, e1004219; 10.1371/journal.pcbi.1004219 (2015).
25. Ingenuity Systems, Redwood City, California, USA. *IPA Network Generation Algorithm* <https://www.ingenuity.com/wp-content/themes/ingenuity-qiagen/pdf/ipa/IPA-netgen-algorithm-whitepaper.pdf> (2005).
26. Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol*. **57**, 289-300 (1995).
27. Carvalho, B. S. & Irizarry, R. A. A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinformatics*. **26**, 2363-2367 (2010).
28. Ritchie, M. E. *et al.* Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. **43**, e47; 10.1093/nar/gkv007 (2015).
29. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. **25**, 402-408 (2001).
30. R Core Team. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. *R: A language and environment for statistical computing* <https://www.R-project.org/> (2016)
31. Howie, B. N., Donnelly, P. & Marchini, J. A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies. *PLoS Genet*. **5**, e1000529; 10.1371/journal.pgen.1000529 (2009).

32. Howie, B., Fuchsberger, C., Stephens, M., Marchini, J. & Abecasis, G. R. Fast and accurate genotype imputation in genome-wide association studies through pre-phasing. *Nat Genet.* **44**, 955-9 (2012).
33. 1000 Genomes Project Consortium, *et al.* A global reference for human genetic variation. *Nature.* **526**, 68-74 (2015).
34. Nyholt, D. R. A simple correction for multiple testing for SNPs in linkage disequilibrium with each other. *Am J Hum Genet.* **74**, 765-769 (2004).
35. Myers, A. J. *et al.* A survey of genetic human cortical gene expression. *Nat Genet.* **39**, 1494-9 (2007).
36. Colantuoni, C. *et al.* Temporal dynamics and genetic control of transcription in the human prefrontal cortex. *Nature.* **478**, 519-23 (2011).
37. Xu, Z. & Taylor, J. A. SNPinfo: integrating GWAS and candidate gene information into functional SNP selection for genetic association studies. *Nucleic Acids Res.* **37**, W600-5; 10.1093/nar/gkp290 (2009).
38. Smith, P. J., Zhang, C., Wang, J., Chew, S. L., Zhang, M. Q. & Krainer, A. R. An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 2490-2508 (2006).
39. Cartegni, L., Wang, J., Zhu, Z., Zhang, M. Q. & Krainer, A. R. ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acid Research.* **31**, 3568-3571 (2003).
40. Fairbrother, W. G., Yeh, R. F., Sharp, P. A. & Burge, C. B. Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science.* **297**, 1007-13 (2002).
41. Peng, Z., Shi, T. & Ma, D. RNF122: a novel ubiquitin ligase associated with calcium-modulating cyclophilin ligand. *BMC Cell Biol.* **11**, 41; 10.1186/1471-2121-11-41 (2010).
42. Jarick, I. *et al.* Genome-wide analysis of rare copy number variations reveals PARK2 as a candidate gene for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry.* **19**, 115-21 (2014).
43. Hegde, A. N. The ubiquitin-proteasome pathway and synaptic plasticity. *Learn Mem.* **17**, 314-27 (2010).
44. Tai, H. C. & Schuman, E. M. Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci.* **9**, 826-38 (2008).

45. Bousman, C. A. *et al.* Preliminary evidence of ubiquitin proteasome system dysregulation in schizophrenia and bipolar disorder: convergent pathway analysis findings from two independent samples. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* **153B**, 494-502 (2010).
46. Rubio, M. D., Wood, K., Haroutunian, V. & Meador-Woodruff, J. H. Dysfunction of the ubiquitin proteasome and ubiquitin-like systems in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* **38**, 1910-20 (2013).
47. Lam, Y. A. *et al.* Inhibition of the ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 9902-6 (2000).
48. Shimura, H. *et al.* Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science.* **293**, 263-9 (2001).
49. Rubinsztein, D. C. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature.* **443**, 780-786 (2006).
50. Glessner, J. T. *et al.* Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature.* **459**, 569-573 (2009).
51. Crider, A., Pandya, C. D., Peter, D., Ahmed, A. O. & Pillai, A. Ubiquitin-proteasome dependent degradation of GABAA α 1 in autism spectrum disorder. *Mol Autism.* **5**, 45; 10.1186/2040-2392-5-45 (2014).
52. Gong, B., Radulovic, M., Figueiredo-Pereira, M. E. & Cardozo, C. The Ubiquitin-Proteasome System: Potential Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease and Spinal Cord Injury. *Front Mol Neurosci.* **9**, 4; 10.3389/fnmol.2016.00004 (2016).
53. Fioravante, D. & Byrne, J. H. Protein degradation and memory formation. *Brain Res Bull.* **85**, 14-20 (2011).
54. Pandya, C. D., Crider, A. & Pillai, A. Glucocorticoid regulates parkin expression in mouse frontal cortex: implications in schizophrenia. *Curr Neuropsychopharmacol.* **12**, 100-7 (2014).
55. Yi, J. J. & Ehlers, M. D. Emerging roles for ubiquitin and protein degradation in neuronal function. *Pharmacol Rev.* **59**, 14-39 (2007).
56. Hamilton, A. M. & Zito, K. Breaking it down: the ubiquitin proteasome system in neuronal morphogenesis. *Neural Plast.* **2013**, 196848; 10.1155/2013/196848 (2013).

57. Speese, S. D., Trotta, N., Rodesch, C. K., Aravamudan, B. & Broadie, K. The ubiquitin proteasome system acutely regulates presynaptic protein turnover and synaptic efficacy. *Curr Biol.* **13**, 899-910 (2003).
58. Ferreira, J. S. *et al.* GluN2B-Containing NMDA Receptors Regulate AMPA Receptor Traffic through Anchoring of the Synaptic Proteasome. *J Neurosci.* **35**, 8462-79 (2015).
59. Rezvani, K., Teng, Y. & De Biasi, M. The ubiquitin-proteasome system regulates the stability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Mol Neurosci.* **40**, 177-84 (2010).
60. Yuen, E. Y. *et al.* Repeated stress causes cognitive impairment by suppressing glutamate receptor expression and function in prefrontal cortex. *Neuron.* **73**, 962-77 (2012).
61. de Bruijn, D. R. *et al.* Severe Progressive Autism Associated with Two de novo Changes: A 2.6-Mb 2q31.1 Deletion and a Balanced t(14;21)(q21.1;p11.2) Translocation with Long-Range Epigenetic Silencing of LRFN5 Expression. *Mol Syndromol.* **1**, 46-57 (2010).
62. Jin, L. *et al.* Ubiquitin-dependent regulation of COPII coat size and function. *Nature.* **482**, 495-500 (2012).
63. Strimbu, K. & Tavel, J. A. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS.* **5**, 463-6 (2010).
64. Sullivan, P. F., Fan, C. & Perou, C. M. Evaluating the comparability of gene expression in blood and brain. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* **141B**, 261-268 (2006).
65. Uher, R. *et al.* Common genetic variation and antidepressant efficacy in major depressive disorder: a meta-analysis of three genome-wide pharmacogenetic studies. *Am J Psychiatry.* **170**, 207-17 (2013).
66. Wang, K. *et al.* Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. *Nature.* **459**, 528-33 (2009).
67. Ripke, S. *et al.* A mega-analysis of genome-wide association studies for major depressive disorder. *Mol Psychiatry.* **18**, 497-511 (2013).
68. Ryan, M. M. *et al.* Gene expression analysis of bipolar disorder reveals downregulation of the ubiquitin cycle and alterations in synaptic genes. *Mol Psychiatry.* **11**, 965-78 (2006).
69. Sesele, K. *et al.* Conditional inactivation of nicastrin restricts amyloid deposition in an Alzheimer's disease mouse model. *Aging Cell.* **12**, 1032-40 (2013).

70. Hatzimanolis, A. *et al.* Multiple variants aggregate in the neuregulin signaling pathway in a subset of schizophrenia patients. *Transl Psychiatry*. **3**, e264; 10.1038/tp.2013.33 (2013).
71. Andrus, B. M. *et al.* Gene expression patterns in the hippocampus and amygdala of endogenous depression and chronic stress models. *Mol Psychiatry*. **17**, 49-61 (2012).
72. Sannino, G. *et al.* Acute stress enhances the expression of neuroprotection- and neurogenesis-associated genes in the hippocampus of a mouse restraint model. *Oncotarget*. **7**, 8455-65 (2016).
73. Williams, N. M. *et al.* Rare chromosomal deletions and duplications in attention-deficit hyperactivity disorder: a genome-wide analysis. *Lancet*. **376**, 1401-8 (2010).
74. Martin, J. *et al.* Biological overlap of attention-deficit/hyperactivity disorder and autism spectrum disorder: evidence from copy number variants. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. **53**, 761-70.e26; 10.1016/j.jaac.2014.03.004 (2014).
75. Fernández-Castillo, N. *et al.* Transcriptomic and genetic studies identify NFAT5 as a candidate gene for cocaine dependence. *Transl Psychiatry*. **5**, e667; 10.1038/tp.2015.158 (2015).
76. Datson, N. A. *et al.* Hippocampal CA1 region shows differential regulation of gene expression in mice displaying extremes in behavioral sensitization to amphetamine: relevance for psychosis susceptibility? *Psychopharmacology (Berl)*. **217**, 525-38 (2011).
77. Malki, K. *et al.* Transcriptome analysis of genes and gene networks involved in aggressive behavior in mouse and zebrafish. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. **171**, 827-38 (2016).
78. Smith, M. *et al.* Molecular genetic delineation of a deletion of chromosome 13q12-->q13 in a patient with autism and auditory processing deficits. *Cytogenet Genome Res*. **98**, 233-9 (2002).
79. Chow, M. L. *et al.* Age-dependent brain gene expression and copy number anomalies in autism suggest distinct pathological processes at young versus mature ages. *PLoS Genet*. **8**, e1002592; 10.1371/journal.pgen.1002592 (2012).
80. Horn, D. *et al.* A Novel Oculo-Skeletal syndrome with intellectual disability caused by a particular MAB21L2 mutation. *Eur J Med Genet*. **58**, 387-91 (2015).
81. Berko, E. R. *et al.* Calder RB1 Mosaic epigenetic dysregulation of ectodermal cells in autism spectrum disorder. *PLoS Genet*. **10**, e1004402; 10.1371/journal.pgen.1004402 (2014).
82. Tian, Y. *et al.* Correlations of gene expression with ratings of inattention and hyperactivity/impulsivity in Tourette syndrome: a pilot study. *BMC Med Genomics*. **5**, 49 (2012).

83. Szatkiewicz, J. P. *et al.* Copy number variation in schizophrenia in Sweden. *Mol Psychiatry*. **19**, 762-73 (2014).
84. Ament, S. A. *et al.* Rare variants in neuronal excitability genes influence risk for bipolar disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **112**, 3576-81 (2015).
85. García-Fuster, M. J. *et al.* FADD adaptor and PEA-15/ERK1/2 partners in major depression and schizophrenia postmortem brains: basal contents and effects of psychotropic treatments. *Neuroscience*. **277**, 541-51 (2014).
86. Adkins, D. E. *et al.* Genome-Wide Meta-Analysis of Longitudinal Alcohol Consumption Across Youth and Early Adulthood. *Twin Res Hum Genet*. **18**, 335-47 (2015).
87. Georgi, B. *et al.* Genomic view of bipolar disorder revealed by whole genome sequencing in a genetic isolate. *PLoS Genet*. **10**, e1004229; 10.1371/journal.pgen.1004229 (2014).
88. Anney, R. *et al.* A genome-wide scan for common alleles affecting risk for autism. *Hum Mol Genet*. **19**, 4072-82 (2010).
89. Codina-Solà, M. *et al.* Integrated analysis of whole-exome sequencing and transcriptome profiling in males with autism spectrum disorders. *Mol Autism*. **6**, 21 (2015).
90. Fromer, M. *et al.* Gene expression elucidates functional impact of polygenic risk for schizophrenia. *Nat Neurosci*. **19**, 1442-53 (2016).
91. Walton, E. *et al.* Correspondence of DNA Methylation Between Blood and Brain Tissue and Its Application to Schizophrenia Research. *Schizophr Bull*. **42**, 406-14 (2016).
92. Chen, Q. *et al.* Association study of CSF2RB with schizophrenia in Irish family and case - control samples. *Mol Psychiatry*. **13**, 930-8 (2008).
93. Chen, P. *et al.* Common SNPs in CSF2RB are associated with major depression and schizophrenia in the Chinese Han population. *World J Biol Psychiatry*. **12**, 233-8 (2011).
94. Moskvina, V. *et al.* Gene-wide analyses of genome-wide association data sets: evidence for multiple common risk alleles for schizophrenia and bipolar disorder and for overlap in genetic risk. *Mol Psychiatry*. **14**, 252-60 (2009).
95. Poelmans, G., Franke, B., Pauls, D. L., Glennon, J. C. & Buitelaar, J. K. AKAPs integrate genetic findings for autism spectrum disorders. *Transl Psychiatry*. **3**, e270; 10.1038/tp.2013.48 (2013).

96. Saia-Cereda, V. M. *et al.* Proteomics of the corpus callosum unravel pivotal players in the dysfunction of cell signaling, structure, and myelination in schizophrenia brains. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* **265**, 601-12 (2015).
97. Iwamoto, K., Ueda, J., Bundo, M., Kojima, T. & Kato T. Survey of the effect of genetic variations on gene expression in human prefrontal cortex and its application to genetics of psychiatric disorders. *Neurosci Res.* **70**, 238-42 (2011).
98. Li, L. *et al.* Decreased Na⁺/K⁺ ATPase α 1 (ATP1A1) gene expression in major depression patients' peripheral blood. *Cent Eur J Biol.* **8**, 1077–1082 (2013).
99. Zhao, J. *et al.* Correlative study of peripheral ATP1A1 gene expression level to anxiety severity score on major depressive disorder patients. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* **27**, 563-67 (2016).
100. Ji, L., Chauhan, A., Brown, W. T. & Chauhan, V. Increased activities of Na⁺/K⁺-ATPase and Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase in the frontal cortex and cerebellum of autistic individuals. *Life Sci.* **85**, 788-93 (2009).
101. Goldstein, I. *et al.* Association between sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase alpha isoforms and bipolar disorders. *Biol Psychiatry.* **65**, 985-91 (2009).
102. Nazeen, S., Palmer, N. P., Berger, B. & Kohane, I. S. Integrative analysis of genetic data sets reveals a shared innate immune component in autism spectrum disorder and its co-morbidities. *Genome Biol.* **17**, 228 (2016).
103. Woodbury-Smith, M. *et al.* Using extended pedigrees to identify novel autism spectrum disorder (ASD) candidate genes. *Hum Genet.* **134**, 191-201 (2015).
104. Nebel, R. A., Kirschen, J., Cai, J., Woo, Y. J., Cherian, K. & Abrahams, B. S. Reciprocal Relationship between Head Size, an Autism Endophenotype, and Gene Dosage at 19p13.12 Points to AKAP8 and AKAP8L. *PLoS One.* **10**, e0129270; 10.1371/journal.pone.0129270 (2015).
105. Bergen, S. E. *et al.* Genome-wide association study in a Swedish population yields support for greater CNV and MHC involvement in schizophrenia compared with bipolar disorder. *Mol Psychiatry.* **17**, 880-6 (2012).
106. Psychosis Endophenotypes International Consortium, *et al.* A genome-wide association analysis of a broad psychosis phenotype identifies three loci for further investigation. *Biol Psychiatry.* **75**, 386-97 (2014).

107. Karszen, A. M. *et al.* Stress-induced changes in primate prefrontal profiles of gene expression. *Mol Psychiatry*. **12**, 1089-102 (2007).
108. Smith, E. N. *et al.* Genome-wide association study of bipolar disorder in European American and African American individuals. *Mol Psychiatry*. **14**, 755-63 (2009).
109. Cotney, J. *et al.* The autism-associated chromatin modifier CHD8 regulates other autism risk genes during human neurodevelopment. *Nat Commun*. **6**, 6404 (2015).
110. Tallaksen, C. M. *et al.* Subtle cognitive impairment but no dementia in patients with spastin mutations. *Arch Neurol*. **60**, 1113-8 (2003).
111. Herberth, M. *et al.* Peripheral profiling analysis for bipolar disorder reveals markers associated with reduced cell survival. *Proteomics*. **11**, 94-105 (2011).
112. Sun, L., Cheng, Z., Zhang, F. & Xu, Y. Gene expression profiling in peripheral blood mononuclear cells of early-onset schizophrenia. *Genom Data*. **5**, 169-70 (2015).
113. Quintela, I. *et al.* Female patient with autistic disorder, intellectual disability, and co-morbid anxiety disorder: Expanding the phenotype associated with the recurrent 3q13.2-q13.31 microdeletion. *Am J Med Genet A*. **167A**, 3121-9 (2015).
114. Wang, J. C. *et al.* A genome-wide association study of alcohol-dependence symptom counts in extended pedigrees identifies C15orf53. *Mol Psychiatry*. **18**, 1218-24 (2013).
115. O'Roak, B. J. *et al.* Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature*. **485**, 246-50 (2012).
116. Gai, X. *et al.* Rare structural variation of synapse and neurotransmission genes in autism. *Mol Psychiatry*. **17**, 402-11 (2012).
117. Hill, W. D. *et al.* Examining non-syndromic autosomal recessive intellectual disability (NS-ARID) genes for an enriched association with intelligence differences. *Intelligence*. **54**, 80-9 (2016).
118. Najmabadi, H. *et al.* Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature*. **478**, 57-63 (2011).
119. Matsunami, N. *et al.* Identification of rare DNA sequence variants in high-risk autism families and their prevalence in a large case/control population. *Mol Autism*. **5**, 5 (2014).

120. Liao, H. M. *et al.* Clinical and molecular characterization of a transmitted reciprocal translocation t(1;12)(p32.1;q21.3) in a family co-segregating with mental retardation, language delay, and microcephaly. *BMC Med Genet.* **12**, 70 (2011).
121. Kastenberger, I. & Schwarzer, C. GPER1 (GPR30) knockout mice display reduced anxiety and altered stress response in a sex and paradigm dependent manner. *Horm Behav.* **66**, 628-36 (2014).
122. Findikli, E. *et al.* Serum levels of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER1) in drug-naive patients with generalized anxiety disorder. *Psychiatry Res.* **244**, 312-6 (2016).
123. Munkholm, K., Peijs, L., Vinberg, M. & Kessing, L. V. A composite peripheral blood gene expression measure as a potential diagnostic biomarker in bipolar disorder. *Transl Psychiatry.* **5**: e614; 10.1038/tp.2015.110 (2015).
124. Crespo-Facorro, B., Prieto, C. & Sainz, J. Schizophrenia gene expression profile reverted to normal levels by antipsychotics. *Int J Neuropsychopharmacol.* **18**. pii: pyu066; 10.1093/ijnp/pyu066 (2014).
125. Peng, Z., Shi, T. & Ma, D. RNF122: a novel ubiquitin ligase associated with calcium-modulating cyclophilin ligand. *BMC Cell Biol.* **11**, 41; 10.1186/1471-2121-11-41 (2010).
126. Latham, C. F. *et al.* Molecular dissection of the Munc18c/syntaxin4 interaction: implications for regulation of membrane trafficking. *Traffic.* **7**, 1408-19 (2006).
127. Horn, D. *et al.* A Novel Oculo-Skeletal syndrome with intellectual disability caused by a particular MAB21L2 mutation. *Eur J Med Genet.* **58**, 387-91 (2015).

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to patients and controls who kindly participated in this research.

The microarrays service was carried out at High Technology Unit (UAT) at Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), Barcelona (Spain) and the Statistics and Bioinformatics Unit (UEB) at the VHIR provided statistical support.

Over the course of this investigation, IGM has been a recipient of a predoctoral fellowship from the Vall d'Hebron Research Institute (PRED-VHIR-2012), Barcelona, Spain, and currently she is a recipient of a contract from the 7th Framework Programme for Research, Technological Development and Demonstration, European Commission (AGGRESSOTYPE_FP7HEALTH2013/602805). CSM is a

recipient of a Sara Borrell contract from the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Spain (CD15/00199) and a mobility grant from the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Spain (MV16/00039). MS is a recipient of a contract from the Biomedical Research Networking Centre in Mental Health (CIBERSAM), Madrid, Spain. PR is a recipient of a predoctoral fellowship from the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR), Generalitat de Catalunya, Spain (2016FI_B 00899). MP is recipient of a predoctoral fellowship from the Vall d'Hebron Research Institute, Barcelona, Spain (PRED-VHIR-2013). ECS is a recipient of a predoctoral fellowship from the Collaborative Research Training Programme for Medical Doctors (PhD4MD), Centre for Genomic Regulation (CRG) and Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), Barcelona, Spain (II14/00018). MR is a recipient of a Miguel de Servet contract from the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Spain (CP09/00119 and CPII15/00023).

This investigation was supported by Instituto de Salud Carlos III (PI12/01139, PI14/01700, PI15/01789, PI16/01505), and cofinanced by the European Regional Development Fund (ERDF), Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca-AGAUR, Generalitat de Catalunya (2014SGR1357, 2014SGR0932), Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Spain (SAF2012-33484, SAF2015-68341-R), the European College of Neuropsychopharmacology (ECNP network: 'ADHD across the lifespan'), Departament de Salut, Generalitat de Catalunya, Spain, and a NARSAD Young Investigator Grant from the Brain & Behavior Research Foundation. This project has also received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the grant agreements No 667302 and 643051.

ADDITIONAL INFORMATION

Authors Contributions

IGM, CSM, MP, EC and PR participated in the DNA and RNA isolation and preparation of samples. IGM, CSM and MS undertook the statistical analyses. VR and EC participated in the clinical assessment and in the recruitment of patients. JARQ and MC participated in the study design, clinical assessment and coordination of the clinical research. MR conceived of the project concept, wrote the protocol, and coordinated the study design and the statistical analyses. MR, JARQ and BC supervised the project and the manuscript preparation. All authors contributed to and have approved the final manuscript.

Competing Financial Interests

Prof. MC has received travel grants and research support from Eli Lilly and Co., Janssen-Cilag, Shire, and Laboratorios Rubió. He has been on the advisory board and served as a consultant for Eli Lilly and Co., Janssen-Cilag, Shire, and Laboratorios Rubió.

Dr. JARQ has served on the speakers' bureau and acted as consultant for Eli Lilly and Co., Janssen-Cilag, Novartis, Lundbeck, Shire, Ferrer, and Laboratorios Rubió. He has received travel awards from Eli Lilly and Co., Janssen-Cilag, and Shire for participating in psychiatric meetings. The ADHD Program chaired by Dr. JARQ has received unrestricted educational and research support from Eli Lilly and Co., Janssen-Cilag, Shire, Ferrer, Rovi, and Laboratorios Rubió in the past two years.

DISCUSSIÓ

1. Consideracions sobre els resultats obtinguts

El coneixement sobre les bases etiològiques del TDAH no ha deixat de créixer des de la seva conceptualització com a trastorn psiquiàtric complex i multifactorial. Tot i que encara es desconeixen les causes exactes que condueixen a la seva aparició, en els darrers anys s'ha produït un canvi molt rellevant en aquesta àrea gràcies a l'elevat nombre d'estudis realitzats, aplicant un ampli ventall d'abordatges i metodologies. Un dels camps que ha experimentat un creixement més significatiu ha estat l'estudi de les bases genètiques subjacents al trastorn, sobretot a arrel del desenvolupament de les tecnologies de genotipació, la millora de les estratègies d'anàlisi estadística i la publicació de dades genòmiques de més d'un miler d'individus de diferents poblacions, que han permès aprofundir en el coneixement de l'estructura i la funció de les variants genètiques del genoma humà. Però també, ha estat gràcies a la creació de xarxes i organismes d'investigació internacionals, que han coordinat i col·laborat en la recerca del TDAH a gran escala i que han fet viable la possibilitat de realitzar estudis amb mostres integrades per desenes de milers d'individus, assolint, així, el poder estadístic necessari per a detectar algunes de les variants que configuren la seva base genètica de susceptibilitat.

Tanmateix, tot i els importants avenços en aquest camp, l'abordatge genètic del TDAH no sempre ha estat capaç d'identificar amb èxit factors genètics consistents i replicables. Per aquest motiu, l'enfocament actual en l'estudi d'aquest trastorn ha patit un profund replantejament i ha redirigit l'atenció vers noves dianes i estratègies d'estudi.

Per una banda, el coneixement de la complexa interrelació que s'estableix entre la susceptibilitat genètica i la influència dels factors ambientals en el desenvolupament i evolució del TDAH, i les evidències que suggereixen que aquesta relació estaria mediada per modificacions epigenètiques, han estimulat l'estudi de l'**epigenoma**. Donat el seu paper crucial en el control del neurodesenvolupament i la funció del sistema nerviós central (SNC), la seva alteració pot conduir al desenvolupament de malalties neurològiques i trastorns psiquiàtrics. Addicionalment, ha augmentat l'interès per l'estudi de l'**impacte de la variació genètica en els elements reguladors** i les seves conseqüències en el control epigenètic, ja que s'estima que aquest mecanisme podria explicar la major part de la varianza fenotípica observada. Considerant el caràcter pleitròpic d'aquest impacte, donat el funcionament fractal d'aquests mecanismes de regulació, el seu estudi podria contribuir a la caracterització de l'heretabilitat genètica inherent als trastorns psiquiàtrics complexos, així com de l'heretabilitat que comparteixen.

Per altra banda, donades les limitacions mostrades per l'abordatge genètic tradicional del TDAH i la seva elevada heretabilitat, i lligat a l'avenç tecnològic i al coneixement de l'arquitectura genètica en panells de referència, s'ha apostat per l'avaluació de forma sistemàtica de milions de variants polimòrfiques al llarg de tot el genoma mitjançant **estudis d'associació a escala genòmica** (GWAS). Aquest abordatge s'ha complementat amb aproximacions **basades en gens** i anàlisis d'enriquiment de **funcions biològiques i vies de senyalització cel·lulars**, que poden resultar més potents en la detecció de *loci* amb múltiples variants de significació llinar i que aporten informació sobre les funcions cel·lulars i vies biològiques específiques potencialment implicades en un trastorn.

En base a aquest context, l'objectiu de la present Tesi Doctoral ha estat contribuir a l'expansió del coneixement sobre les **bases genètiques del TDAH** principalment a través de la realització d'estudis d'**associació cas-control poblacionals**, tant per mitjà d'estratègies basades en l'anàlisi d'**elements reguladors candidats -els microARNs-**, com a través de l'estudi de **variants genètiques al llarg de tot el genoma humà**, complementat amb anàlisis **basades en gens** i estudis d'enriquiment de **funcions i vies de senyalització**.

1.1. El paper dels microARNs en el TDAH: els grups miR-183-96-182 i miR-34b/c

En el present treball de Tesi Doctoral, a través d'estudis d'associació cas-control basats en gens i regions candidates, s'han avaluat diverses variants polimòrfiques ubicades en *loci* que contenen microARNs o algunes de les seves dianes de regulació validades que havien mostrat evidències prèvies d'associació amb el TDAH o altres trastorns psiquiàtrics. Aquest abordatge ha permès detectar per primera vegada l'associació entre el TDAH i els grups **miR-183-96-182** i **miR-34b/c**, així com de les seves dianes ***HTR1B*, *MET*, *NOTCH2* i *HMGA2***, respectivament.

Concretament, s'han mostrat evidències d'associació entre el transcrit primari del mir-34b/c (primir-34b/c) i TDAH, així com de la sobre-expressió del miR-34c i una tendència pel miR-34b en la mateixa direcció, en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMcs) d'adults amb TDAH. Aquests resultats situen aquests dos microARNs com a biomarcadors potencials pel trastorn i estan en línia amb les alteracions de la seva expressió prèviament descrites en individus amb malaltia de Parkinson, malaltia de Alzheimer o malaltia de Huntington. En l'àmbit dels trastorns psiquiàtrics, s'ha reportat un increment dels nivells d'aquests dos microARNs en subjectes amb trastorn depressiu major, un augment del miR-34b en individus amb trastorns de l'espectre autista i la possible participació del miR-34c en

l'ansietat a través de la seva acció sobre el receptor de l'hormona alliberadora de corticotropina (*CRHR1*) (Sun *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2015; Miñones-Moyano *et al.*, 2011; Gaughwin *et al.*, 2011; Zovoilis *et al.*, 2011; Haramati *et al.*, 2011). Aquests resultats se sumen a les evidències prèvies que suggereixen una base genètica compartida entre els diferents trastorns psiquiàtrics (Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium *et al.*, 2013a; Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2013b; Cristino *et al.*, 2014).

Per altra banda, en les anàlisis de trets quantitius d'expressió (eQTLs) s'ha detectat que la variant rs4938723 en el pri-mir-34b/c actua com a *cis*-eQTL del miR-34b i el miR-34c. Estudis previs han descrit que aquest polimorfisme estaria influïent en els nivells d'expressió del pri-mir-34b/c tant per mitjà de mecanismes epigenètics com genètics, ja que a més de trobar-se situat en una illa CpG de la regió promotora d'aquest transcrit, l'al·lel C estaria creant una regió d'unió a factors de transcripció tipus GATA, el que augmentaria l'expressió d'ambdós microARNs. En línia amb aquestes dades, en el present estudi, s'ha trobat que la dosi de l'al·lel C de la variant rs4938723 es correlaciona amb una major expressió tant del miR-34b com del miR-34c en PBMCs de subjectes amb TDAH. A més, s'ha detectat que aquest polimorfisme actua com a *trans*-eQTL de 681 transcrits, entre els que s'han identificat gens prèviament associats al trastorn -com *SYT2*, *HTR2C*, *BDNF*, *VAMP2* o *TPH2*-, així com una sobre-representació de dianes d'unió validades i predites del miR-34b i/o el miR-34c, i enriquiment de gens implicats en el desenvolupament neuronal i l'axonogènesi, i la biosíntesi i metabolisme lipídic, processos que a més d'estar relacionats entre ells, estarien alterats en el TDAH (Yang *et al.*, 2013; Young *et al.*, 2004; Antalis *et al.*, 2006). En conjunt, aquests resultats apunten a la contribució del grup miR-34b/c en el TDAH a través de mecanismes moleculars que implicarien la seva desregulació i la d'altres gens prèviament associats al trastorn o que participen en processos biològics potencialment implicats en la seva etiologia.

A més, algunes de les dianes validades del grup miR-34b/c, que han estat associades nominalment al TDAH en aquest estudi -com els gens *MET* i *NOTCH2*-, havien estat prèviament associades a trastorns de l'espectre autista, resultats que estarien en línia amb les evidències que recolzen el solapament de part de la base genètica d'aquests dos trastorns, i que podrien explicar la seva elevada co-ocurrència i l'existència de trets neuropsicològics i substrats neurobiològics comuns (Campbell *et al.*, 2006; Levitt *et al.*, 2004; Hedrick *et al.*, 2012; Garbett *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2013; Volk *et al.*, 2014; Martin *et al.*, 2014; Berenguer-Forner *et al.*, 2015; Naaijen *et al.*, 2017).

Alhora, a més dels miR-34b i 34c, s'han aportat evidències preliminars sobre la participació en el TDAH de variants genètiques en altres microARNs. En concret, per primer cop, s'ha identificat l'associació nominal entre el TDAH sense trastorns per ús de substàncies (TUS) i TDAH sense TUS ni trastorns disruptius de la conducta, i dues variants del *locus* que conté el grup miR-183-96-182. La contribució d'aquests microARNs a la susceptibilitat a desenvolupar TDAH podria explicar-se a través de la desregulació del receptor *HTR1B*, així com d'altres dianes validades que juguen un paper important en el desenvolupament o la funció del SNC, com ara el receptor gamma d'àcid retinoic (*RARG*), implicat en el control de la senyalització dopaminèrgica, o de gens implicats en el control dels ritmes circadians - sovint alterats en infants i adults amb TDAH-, com ara l'adenilat ciclasa 6 (*ADCY6*), el regulador del rellotge circadià (*CLOCK*) o el pèptid inductor de la son delta (*DSIP*) (Coogan i McGowan, 2017; Krezel *et al.*, 1998). De fet, diversos estudis en models animals recolzen el paper del grup miR-183-96-182 en el control dels ritmes circadians (Xu *et al.*, 2007; Ding *et al.*, 2015).

L'estudi del paper del grup miR-183-96-182 i el gen *HTR1B* en el TDAH persistent s'ha realitzat en base a l'existència de dades prèvies sobre la seva participació en el trastorn i la conducta agressiva, així com en l'activitat locomotora induïda per metilfenidat en ratolins (Hawi *et al.*, 2002; Saudou *et al.*, 1994; Jensen *et al.*, 2009; Guimarães *et al.*, 2009). Aquest grup de microARNs s'expressa al cervell amb patrons específics segons la regió, i està implicat en la plasticitat neuronal i els ritmes circadians, l'aprenentatge i la formació de la memòria (Juhila *et al.*, 2011; Woldemichael *et al.*, 2016). Tot i que el número d'estudis és força limitat i mostren algunes inconsistències, aquests microARNs també s'han relacionat amb diversos trets i trastorns psiquiàtrics com l'esquizofrènia, l'estress crònic, l'insomni tardà en trastorn depressiu major i l'abús/dependència a l'alcohol (Rizos *et al.*, 2012; Rizos *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016; Saus *et al.*, 2010; Ignacio *et al.*, 2015).

Finalment, cinc *loci* addicionals han mostrat associació nominal amb el TDAH en els estudis aquí presentats, incloent els grups *let-7a-1/let-7f-1/let-7d*, *let-7a-3/mir-4763/let-7b*, i *mir-371-372-373*, i el microARN *mir-128-2*, els nivells alterats dels quals havien estat prèviament associats a TDAH, esquizofrènia, trastorn depressiu major, trastorns de l'espectre autista o a la resposta a l'administració crònica de cocaïna (Maffioletti *et al.*, 2016; Gururajan *et al.*, 2016; Belzeaux *et al.*, 2012; Beveridge *et al.*, 2010; Chandrasekar *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2009; Abu-Elneel *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2015; Wan *et al.*, 2015). A més, cal esmentar que entre les dianes gèniques experimentalment validades dels microARNs nominalment associats al TDAH, s'inclouen gens implicats en la seva pròpia biogènesi (*DICER*, *LIN28*, *AGO1*, *AGO4* o *TRIM71*), gens associats a trastorns psiquiàtrics, incloent el TDAH

(*DRD3*, *NTKR3*, *erbB4* o *NR4A2*), o gens que s'han identificat en el model animal de rata hipertensa espontània (SHR) (*LGALS3* i *LDLR*) (Ha i Kim, 2014; Volkow *et al.*, 2011; Ribasés *et al.*, 2008; Furth *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2010; Yamamoto *et al.*, 2013). Considerant que alguns d'aquests gens estan regulats per més d'un dels microARNs identificats en aquest estudi, els resultats suggereixen l'existència d'una xarxa de regulació solapada i amb possibles funcions redundants, potencialment implicada en els processos biològics subjacents al TDAH i a altres trastorns psiquiàtrics.

1.2. Estudis d'associació a escala genòmica en TDAH persistent

En els estudis inclosos en aquest bloc, s'ha apostat per un abordatge lliure d'hipòtesi basat en l'anàlisi massiu de milions de variants al llarg de tot el genoma mitjançant GWAS, complementat amb estudis d'enriquiment de gens implicats en funcions cel·lulars i processos biològics específics. Aquest abordatge ha permès la identificació de noves variants de risc per TDAH en els gens que codifiquen per la proteïna amb caixa F 33 (***FBXO33***) i la proteïna dit-anell 122 (***RNF122***), així com la identificació del **sistema ubiquitina-proteosoma** com a procés candidat potencialment implicat en l'etiologia del trastorn.

1.2.1. El gen *FBXO33*

En el present treball s'ha realitzat el primer GWAS en població adulta amb TDAH mitjançant genotipació individual, seguit d'una rèplica i un estudi metanalític considerant tres mostres d'origen europeu. Els resultats han proporcionat evidències preliminars sobre la participació del gen *FBXO33* en la susceptibilitat a desenvolupar TDAH persistent. Aquest gen codifica pel component de reconeixement de substrat d'un complex E3 ubiquitina-ligasa *SCF* (*SKP1-CUL1-Fbox*), una maquinària catalítica implicada en el procés d'ubiquitinació de les proteïnes i la seva degradació per mitjà del proteosoma (Lutz *et al.*, 2006). Existeixen evidències suggestives sobre la possible implicació del gen *FBXO33* en els trastorns psiquiàtrics. Així, s'ha identificat una translocació balancejada entre els cromosomes 14 i 21 que inclou aquest gen en un subjecte amb autisme progressiu sever, tot i que no es va observar que el reordenament alterés el seu nivell d'expressió. En el mateix estudi, es van utilitzar tres controls amb delecions al cromosoma 14 que incloïen el gen *FBXO33*, i que presentaven certs trets neurològics i/o psiquiàtrics, com ara alteracions de l'aprenentatge o retard mental lleu, o fins i tot, signes de dèficit d'atenció i hiperactivitat en un dels casos (de Brujin *et al.*, 2010). Per altra banda, en un estudi GWAS es va reportar l'associació entre dues variants properes al *locus* del gen *FBXO33* i trastorns de l'espectre

autista, resultats que es van replicar en dues cohorts independents (Wang *et al.*, 2009). De nou, els resultats obtinguts en l'estudi presentat aquí, se sumen a altres evidències reportades en aquest Treball de Tesi Doctoral que recolzen l'existència d'un substrat neurobiològic comú i d'una base genètica compartida entre el TDAH i els trastorns de l'espectre autista (Berenguer-Forner *et al.*, 2015).

Aquesta és la primera vegada que es reporta l'associació entre el gen *FBXO33* i el TDAH, i roman per ser descobert el mecanisme exacte pel qual aquest gen contribueix a la vulnerabilitat a desenvolupar el trastorn. Tot i que en aquest estudi no s'han identificat senyals que superin el llindar de significació genòmica (P -valor $<5 \cdot 10^{-8}$), la presència de múltiples polimorfismes de nucleòtid únic (SNP) associats a TDAH i distribuïts per tot el *locus* del gen, així com els resultats positius de l'anàlisi d'associació basada en gens, recolzen la implicació del *FBXO33* en el trastorn. Addicionalment, s'han reportat evidències d'associació nominal entre aquest gen i el TDAH en el subseqüent estudi de rèplica utilitzant les dades de la metanàlisi de GWAS del subgrup de TDAH, realitzada en el marc del Consorci de Genòmica en Psiquiatria (PGC; Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2013b). Tot i que no es pot discriminar si la contribució d'aquest gen està mediada per una única variant o per la suma de l'efecte de múltiples variants de la regió, s'han identificat diversos polimorfismes amb potencial valor funcional que podrien explicar els mecanismes moleculars darrera la seva associació, el que encaixaria amb l'heterogènia genètica inherent al TDAH. Així, s'han identificat variants que actuen com a *cis*-QTLs de l'expressió del *FBXO33* o que estan implicats en el volum de substància grisa de la regió del gir post-central esquerra, una àrea cerebral que forma part de la xarxa de l'atenció i que està implicada en el processament motor, dos dominis cognitius afectats en el TDAH (Stray *et al.*, 2013). Per altra banda, també s'ha identificat una variant ubicada en una regió exònica potenciadora de *splicing* (ESE) que podria afectar la regulació del *splicing* alternatiu, així com variants que podrien tenir un paper funcional en els patrons de metilació o en la unió a factors de transcripció.

A banda del gen *FBXO33*, entre les associacions més significatives identificades al GWAS en TDAH adult, s'han detectat altres gens prèviament relacionats amb trastorns psiquiàtrics i amb potencial interès en el TDAH. Per exemple, els gens que codifiquen per la proteïna farnesilada peroxisomal 19 (*PEX19*) i per la proteïna del complex coatomer subunitat alfa (*COPA*), s'han trobat associats als trastorn depressiu major i al trastorn bipolar, respectivament (Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric GWAS Consortium *et al.*, 2013; Ryan *et al.*, 2006). S'han identificat variants al gen que codifica per la subunitat reguladora del canal de potassi dependent de voltatge 4 (*KCNQ4*) potencialment associades al consum d'alcohol en joves, i al trastorn bipolar en una població Amish

(Adkins *et al.*, 2015; Georgi *et al.*, 2014). Per la seva banda, el gen que codifica per la protocadherina 17 (*PCDH17*) s'ha trobat implicat en la cognició i la personalitat, s'ha associat al risc de desenvolupar trastorns majors de l'ànim, i s'ha trobat sobre-expressat en cervell de subjectes amb esquizofrènia (Chang *et al.*, 2017; Dean *et al.*, 2007). El gen que codifica per la proteïna amb domini dit de zinc i SCAN 12 (*ZSCAN12*), s'ha identificat en un estudi recent on s'ha avaluat el solapament genètic entre els cinc majors trastorns psiquiàtrics (esquizofrènia, trastorn bipolar, trastorns de l'espectre autista, trastorn depressiu major i TDAH), i on ha mostrat una associació significativa tant amb la mostra global com, de forma individual, amb el trastorn bipolar, l'esquizofrènia, el trastorn depressiu major i el TDAH (Zhao i Nyholt, 2017). Per la seva banda, el gen que codifica per la proteïna embriogènica letal de visió anormal 2 (*ELAVL2*) ha estat prèviament associat a esquizofrènia i podria ser potencialment rellevant en els trastorns de l'espectre autista i el trastorn bipolar (Yamada *et al.*, 2011; Iossifov *et al.*, 2014; Berto *et al.*, 2016; Georgieva *et al.*, 2014). I, finalment, existeixen evidències que recolzen el paper de la fosfodiesterasa 4B (*PDE4B*) en l'esquizofrènia, el trastorn depressiu major, el trastorn bipolar i els trastorns de l'espectre autista, així com de la possible implicació del gen que codifica pel canal catiònic neuronal sensor d'amiloide 1 (*ACCN1*) en els trastorns de l'espectre autista, el trastorn de pànic i en la resposta al tractament farmacològic del trastorn bipolar i del trastorn depressiu major (Millar *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2016; Numata *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2017; Braun *et al.*, 2007; Kähler *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Otowa *et al.*, 2012; Stone *et al.*, 2007; Garriock *et al.*, 2010; Squassina *et al.*, 2011).

1.2.2. El gen *RNF122*

Emprant les dades de l'estudi GWAS discutit a l'apartat anterior, s'ha aplicat un disseny basat en gens que ha permès identificar 40 gens amb evidències suggestives d'associació amb el TDAH (P-valor<1e-03), on el gen més significatiu, el gen de la família CTAGE membre 5 (*CTAGE5*), excedia el llindar de significació corregit pel mètode Bonferroni (P-valor<1e-06). Les anàlisis d'expressió d'aquests gens han revelat un augment de l'expressió del gen *RNF122* en PBMCs de subjectes adults amb TDAH, situant aquest gen com a un possible biomarcador del trastorn en l'adult. Els resultats que es reporten en aquest estudi són els primers en suggerir el possible rol d'aquests gens en els trastorns psiquiàtrics i, en concret, en el TDAH.

La informació disponible sobre el gen *RNF122* és força limitada, però s'ha descrit que codifica per una proteïna ubicada al reticle endoplasmàtic i a l'aparell de Golgi, i que donada la seva capacitat per induir apoptosi i necrosi, podria estar implicada en els processos inflamatoris, així com en la viabilitat

cel·lular (Woelk *et al.*, 2006). Es caracteritza per un domini dit-anell que intervé en les interaccions proteïna-proteïna i proteïna-ADN, i s'ha catalogat com a una nova E3 ubiquitina ligasa que pot ubiquitinar-se a sí mateixa i, per tant, ser processada i degradada pel proteosoma (Peng *et al.*, 2010).

En aquest estudi, s'han variants genètiques al llarg de tot el *locus* del gen *RNF122* que mostraven una associació suggestiva amb el TDAH, tres dels quals van superar el llindar de significació corregit per múltiples comparacions mitjançant l'algoritme del programa SNPSpD (*Single Nucleotide Polymorphism Spectral Decomposition* - <https://neurogenetics.qimrberghofer.edu.au/SNPSpDlite/>). Totes les variants de la regió constitueixen un únic bloc en desequilibri de lligament (LD), on l'associació més significativa correspon a la variant genotipada rs3735951, ubicada a l'exó 2 del gen. Aquesta variant explica tota l'associació detectada entre aquest *locus* i el TDAH, sense evidències d'efectes independents exercits per SNPs addicionals. Tot i que els resultats indiquen que aquesta variant no es comporta com a *cis*-eQTL pel gen *RNF122*, sí que s'ha identificat el seu possible rol en la regulació del *splicing* alternatiu, ja que està situada en una regió de *splicing* exònic. Mentre que l'al·lel de risc T crearia una regió potenciadora ESE, amb afinitat pels factors SRSF2 i SRSF5, l'al·lel C generaria una regió silenciadora (ESS). La disrupció del *splicing* constitutiu i l'alteració de la seqüència madura d'aquest transcrit podria comprometre l'especificitat de la unió a substrats i afectar la capacitat d'ubiquitinació d'aquesta E3 ubiquitina-ligasa. Tanmateix, aquest mecanisme no explicaria les diferències d'expressió del *RNF122* en PBMCs de subjectes amb TDAH. En aquest sentit, quatre polimorfismes que no van demostrar associació amb el trastorn, s'han identificat com a *cis*-eQTLs del gen *RNF122* amb una significació llindar, dos dels quals amb evidències suggestives de ser-ho també en còrtex cerebral ($P_{rs117469767}=0,045$; $P_{74630292}=0,05$; informació no inclosa a l'article) (Myers *et al.*, 2007). Aquests resultats suggereixen que els mecanismes darrera l'associació genètica del gen *RNF122* i la susceptibilitat a desenvolupar el TDAH, serien diferents dels que explicarien l'associació del trastorn amb l'alteració dels seus nivells d'expressió.

Pel que fa a la resta de gens identificats en aquest estudi, la majoria d'ells han estat prèviament relacionats amb els trastorns psiquiàtrics en, com a mínim, un estudi i, per tant, es presenten com a bons candidats per a ser avaluats en més profunditat en el TDAH (Taula 9). Alguns d'aquests, a més, ja s'havien identificat en el GWAS basat en SNPs, descrit a l'apartat anterior. Cal ressaltar que els gens *CTAGE5*, *FBXO33*, *MIA2* i *PNN*, que corresponen a algunes de les millors senyals de l'estudi basat en gens, estan inclosos en les delecions del cromosoma 14 identificades en els tres subjectes control de l'estudi d'autisme progressiu sever esmentat anteriorment, els quals presentaven certs trets neurològics

i/o psiquiàtics, incloent signes de dèficit d'atenció i hiperactivitat en un dels casos (de Brujin *et al.*, 2010).

Taula 9a. Resultats de l'anàlisi de GWAS basat en gens considerant tots els SNPs de cada locus.

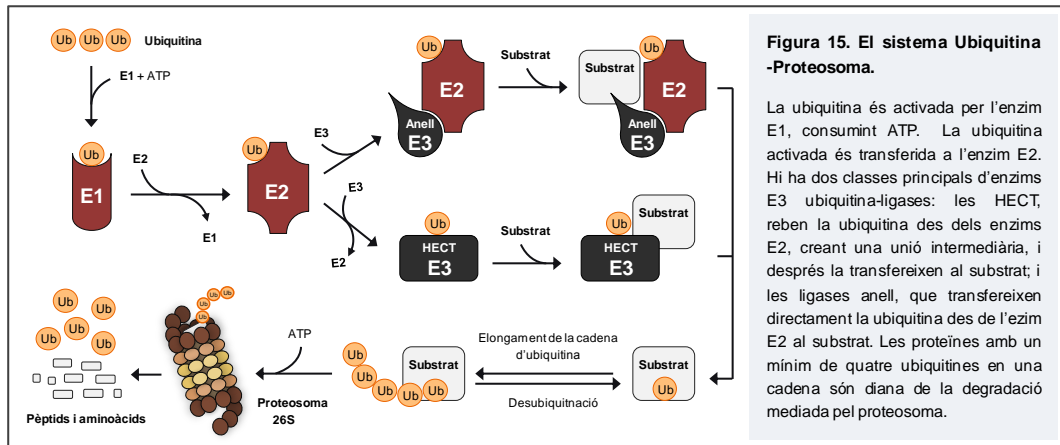
Cr	Gen	Trastorns neurobiològics i psiquiàtics potencialment associats
14	<i>CTAGE5</i>	Eficàcia dels antidepressius en trastorn depressiu major, retard mental lleu, i trets d'inatenció i hiperactivitat (GENDEP Investigators <i>et al.</i> , 2013; de Brujin <i>et al.</i> , 2010)
14	<i>FBXO33</i>	Autisme, retard mental lleu i TDAH (Wang <i>et al.</i> , 2009; de Brujin <i>et al.</i> , 2010; Sánchez-Mora <i>et al.</i> , 2015)
14	<i>MIA2</i>	Retard mental lleu, i trets d'inatenció i hiperactivitat (de Brujin <i>et al.</i> , 2010)
1	<i>PEX19</i>	Trastorn depressiu major i TDAH (Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric GWAS Consortium <i>et al.</i> , 2013; Sánchez-Mora <i>et al.</i> , 2015)
1	<i>COPA</i>	Trastorn bipolar i TDAH (Ryan <i>et al.</i> , 2006; Sánchez-Mora <i>et al.</i> , 2015)
14	<i>PNN</i>	Retard mental lleu, i trets d'inatenció i hiperactivitat (de Brujin <i>et al.</i> , 2010)
1	<i>WDR42A</i>	-
1	<i>NCSTN</i>	Malaltia d'Alzheimer i esquizofrènia (Sesele <i>et al.</i> , 2013; Hatzimanolis <i>et al.</i> , 2013)
1	<i>MAST2</i>	-
1	<i>CASQ1</i>	-
15	<i>CALML4</i>	Malaltia de Huntington, trastorn depressiu major i estrès (Labadorf <i>et al.</i> , 2016; Andrus <i>et al.</i> , 2012; Sannino <i>et al.</i> , 2016)
1	<i>ZP4</i>	TDAH (Williams <i>et al.</i> , 2010; Martin <i>et al.</i> , 2014)
1	<i>IPP</i>	Dependència a cocaïna (Fernández-Castillo <i>et al.</i> , 2015)
1	<i>TMEM69</i>	Efectes de l'amfetamina i agressivitat (Datson <i>et al.</i> , 2011; Malki <i>et al.</i> , 2016)
4	<i>MAB21L2</i>	Autisme i deficiència intel·lectual (Smith <i>et al.</i> , 2002; Chow <i>et al.</i> , 2012; Hom <i>et al.</i> , 2015)
1	<i>GPBP1L1</i>	Autisme i trets d'inatenció en Síndrome de Tourette (Berko <i>et al.</i> , 2014; Tian <i>et al.</i> , 2012)
1	<i>STXBP3</i>	-
13	<i>MLNR</i>	-
2	<i>NLRC4</i>	Esquizofrènia i trastorn bipolar (Szatkiewicz <i>et al.</i> , 2014; Ament <i>et al.</i> , 2015)
1	<i>PEA15</i>	Trastorn depressiu major (García-Fuster <i>et al.</i> , 2014)

Taula 9b. Resultats de l'anàlisi de GWAS basat en gens considerant el 10% més significatiu dels SNPs de cada locus

Cr	Gen	Trastorns neurobiològics i psiquiàtics potencialment associats
16	<i>KCNQ4</i>	Consum d'alcohol i trastorn bipolar en Amish (Adkins <i>et al.</i> , 2015; Georgi <i>et al.</i> , 2014)
16	<i>TAF1C</i>	Autisme i esquizofrènia (Anney <i>et al.</i> , 2010; Anney <i>et al.</i> , 2012; Codina-Solà <i>et al.</i> , 2015; Fromer <i>et al.</i> , 2016)
22	<i>NCF4</i>	Esquizofrènia (Walton <i>et al.</i> , 2016)
22	<i>CSF2RB</i>	Esquizofrènia, trastorn depressiu major i trastorn bipolar (Chen <i>et al.</i> , 2008; Chen <i>et al.</i> , 2011; Moskvina <i>et al.</i> , 2009)
17	<i>AKAP10</i>	Autisme, esquizofrènia i trastorn bipolar (Poelmans <i>et al.</i> , 2013; Saia-Cereda <i>et al.</i> , 2015; Iwamoto <i>et al.</i> , 2011)
1	<i>ATP1A1</i>	Trastorn depressiu major, ansietat, autisme i trastorn bipolar (Li <i>et al.</i> , 2013; Zhao <i>et al.</i> , 2016a; Ji <i>et al.</i> , 2009; Goldstein <i>et al.</i> , 2009)
8	<i>DUSP26</i>	Eficàcia dels antidepressius en trastorn depressiu major (GENDEP Investigators <i>et al.</i> , 2013)
12	<i>RAP1B</i>	Autisme (Nazeen <i>et al.</i> , 2016; Woodbury-Smith <i>et al.</i> , 2015)
19	<i>AKAP8</i>	Autisme (Poelmans <i>et al.</i> , 2013; Nebel <i>et al.</i> , 2015)
20	<i>RIN2</i>	Trastorn bipolar, esquizofrènia i estrès (Smith <i>et al.</i> , 2009; Bergen <i>et al.</i> , 2012; Psychosis Endophenotypes International Consortium <i>et al.</i> , 2014; Karssen <i>et al.</i> , 2007)
2	<i>SPAST</i>	Autisme i dèficit cognitiu (Cotney <i>et al.</i> , 2015; Tallaksen <i>et al.</i> , 2003)
7	<i>CCL26</i>	Esquizofrènia i trastorn bipolar (Sun <i>et al.</i> , 2015; Herberth <i>et al.</i> , 2011; Giusti <i>et al.</i> , 2016)
20	<i>NAT5</i>	Autisme i ansietat comòrbida (Quintela <i>et al.</i> , 2015)
8	<i>RNF122</i>	Eficàcia dels antidepressius en trastorn depressiu major (GENDEP Investigators <i>et al.</i> , 2013)
15	<i>C15orf53</i>	Trastorn bipolar i dependència a alcohol (Smith <i>et al.</i> , 2009; Ferreira <i>et al.</i> , 2008; Wang <i>et al.</i> , 2013)
7	<i>GPR146</i>	Autisme (O'Roak <i>et al.</i> , 2012; Gai <i>et al.</i> , 2012)
8	<i>C8orf41</i>	Eficàcia dels antidepressius en trastorn depressiu major i dèficit cognitiu (GENDEP Investigators., 2013; Hill <i>et al.</i> , 2016; Najmabadi <i>et al.</i> , 2011)
2	<i>MEMO1</i>	-
12	<i>ALX1</i>	Autisme i trets cognitiu (Matsunami <i>et al.</i> , 2014; Liao <i>et al.</i> , 2011)
7	<i>GPER1</i>	Ansietat i estrès, trastorn bipolar i tractament antipsicòtic esquizofrènia (Kastenberger i Schwarzer, 2014; Findikli <i>et al.</i> , 2016; Munkholm <i>et al.</i> , 2015; Crespo-Facorro <i>et al.</i> , 2014)

1.2.3. El paper del sistema ubiquitina-proteosoma en els trastorns psiquiàtrics i el TDAH

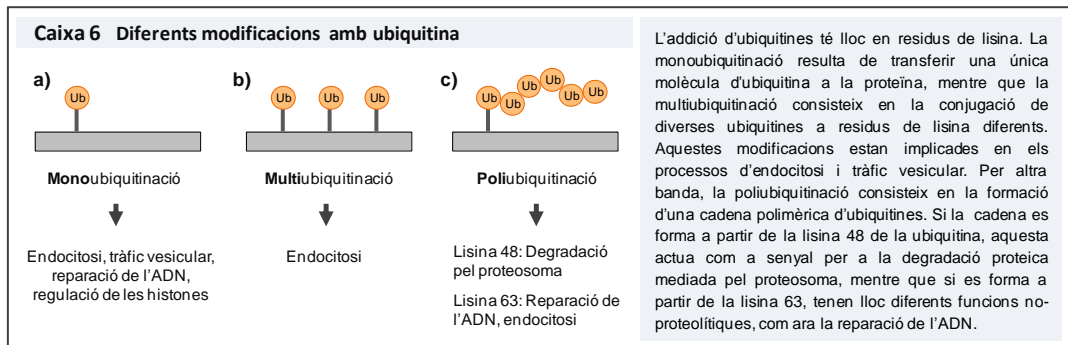
Els estudis GWAS en adults amb TDAH basats en SNPs i en gens realitzats en el marc d'aquesta Tesi Doctoral, han permès identificar l'associació suggestiva entre els gens *FBXO33* i *RNF122*, i el TDAH persistent, i han aportat evidències que recolzen el possible paper de la **via de degradació proteica ubiquitina-proteosoma** en el TDAH (Figura 15).



El sistema ubiquitina-proteosoma és la principal via cel·lular de catabolisme proteic. Aquest procés té lloc tant al nucli cel·lular com al citoplasma, i consta de dos passos principals: la **conjugació** covalent d'**ubiquitines** a la proteïna diana, formant una cadena polimèrica, i la **degradació** de la proteïna marcada mitjançant el complex multiproteic del **proteosoma**. Durant la conjugació de la ubiquitina, tenen lloc tres processos enzimàtics duts a terme pels enzims **E1**, **E2** i **E3**. E1 activa la ubiquitina, que passa a l'enzim E2, que la conjuga i la transfereix al substrat, en un procés dependent de l'enzim **E3 ligasa**. L'especificitat de la unió al substrat recau principalment sobre els enzims **E3 ligasa**, que poden constituir proteïnes individuals o complexos multiproteics. Aquest procés es repeteix fins a la formació de cadenes de múltiples ubiquitines que són reconegudes pel proteosoma, el qual proteolitza el substrat marcat en petits pèptids i aminoàcids. El sistema de degradació ubiquitina-proteosoma està implicat en la regulació de la majoria dels processos que tenen lloc a la cèl·lula i, per tant, és essencial per al manteniment de la seva homeòstasi. (Yi i Ehlers, 2007; Metzger *et al.*, 2012; Dennissen *et al.*, 2012; Alberts *et al.*, 2002).

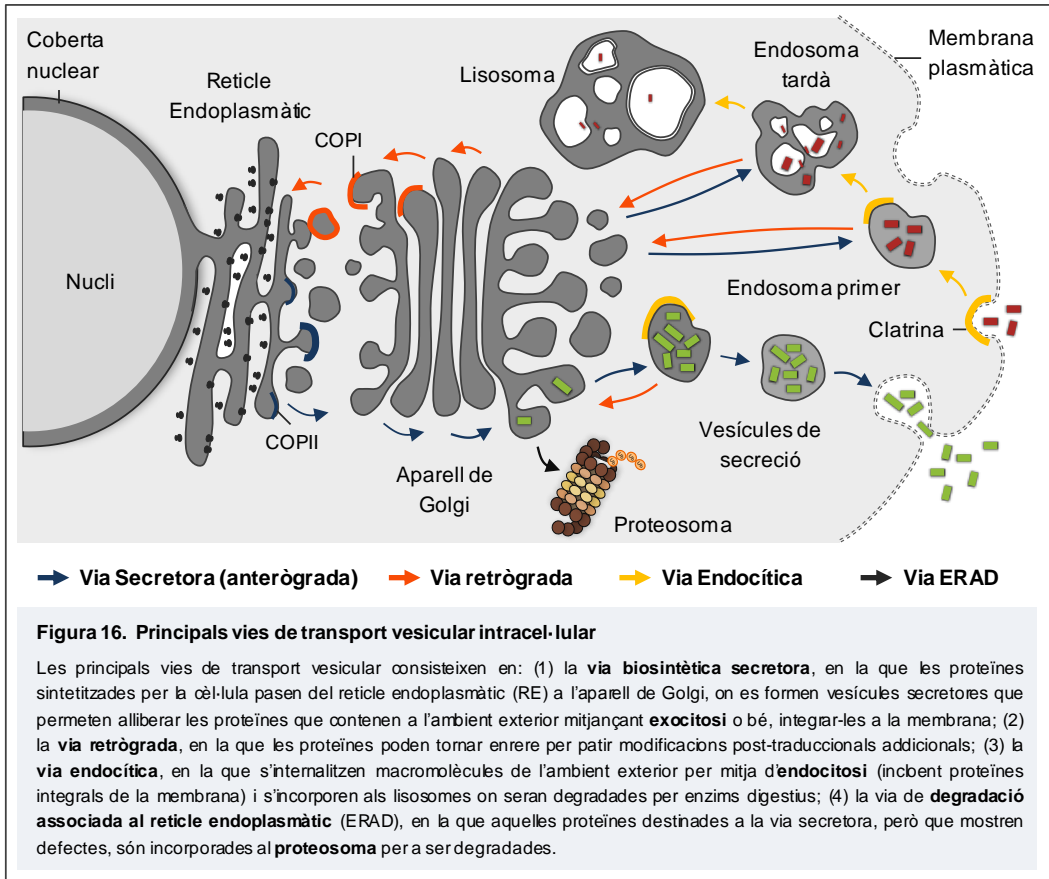
Per altra banda, a més de marcar les proteïnes per a la seva degradació, depenent del nombre d'ubiquitines incorporades o del tipus d'unió establerta, aquest procés participa en moltes altres funcions

(Caixa 6) (Yi i Ehlers, 2007; Metzger *et al.*, 2012; Dennissen *et al.*, 2012; Alberts *et al.*, 2002). En aquest sentit, els nostres estudis han permès identificar gens que amplien els marges del paper del sistema ubiquitina-proteosoma en el TDAH, ja que impliquen processos de transport vesicular íntimament relacionats amb aquest sistema. La ubiquitinació pot actuar com a senyal tant per a dirigir la incorporació de proteïnes d'origen biosintètic a la membrana plasmàtica en la **via secretora**, com per a promoure l'eliminació de proteïnes de la membrana plasmàtica a través de la **via endocítica** i la **monoubiquitinació** (Figura 16). En la via secretora, durant la traducció, quan la maduració de les proteïnes és imperfecta i es generen polipèptids defectuosos, aquests són eliminats mitjançant l'acció del sistema ubiquitina-proteosoma, en un procés denominat **degradació associada al reticle endoplasmàtic (ERAD)**. En l'endocitosi, la monoubiquitinació està implicada en el transport vesicular que s'estableix entre l'aparell de Golgi, la membrana endoplasmàtica i els lisosomes, sobretot participant en la internalització de proteïnes transmembrana i en la seva distribució. La monoubiquitinació de les proteïnes desencadena la seva endocitosi i actua com a senyal per a determinar si són dirigides al lisosoma per a ser degradades o si es reciclen (Caixa 6).



Degut a l'ampli ventall de processos cel·lulars en els que participa el sistema ubiquitina-proteosoma i la xarxa de tràfic vesicular de les vies secretora i endocítica, l'alteració de les seves funcions afecta la qualitat, quantitat i localització de les proteïnes de membrana, amb importants efectes en el funcionament cel·lular que poden conduir a l'aparició de fenotips i al desenvolupament patologies. Múltiples estudis descriuen l'important paper del sistema ubiquitina-proteosoma i de la xarxa de tràfic vesicular en el desenvolupament i la funció del SNC, en processos com ara la plasticitat sinàptica i la memòria. Les conseqüències de la seva desregulació s'han descrit en malalties neurològiques com la malaltia de Huntington, la malaltia de Parkinson o la malaltia d'Alzheimer, i en trastorns psiquiàtrics com el trastorn bipolar, l'esquizofrènia o els trastorns de l'espectre autista (Tai i Schuman, 2008; Hegde AN,

2010; Louros i Osterweil, 2016; Dennissen *et al.*, 2012; Bousman *et al.*, 2010a i 2010b; Rubio *et al.*, 2013; Crider *et al.*, 2014; Schmidt i Finley, 2014; Dantuma i Bott, 2014).



A més, dos estudis recents han aportat evidències sobre la possible participació d'aquest sistema en el TDAH. Per una banda, en un estudi GWAS considerant la funció atencional en un subgrup d'individus de la mateixa mostra de TDAH emprada en els estudis aquí presentats, es va detectar una sobre-representació de gens implicats en els sistema ubiquitina-proteosoma, així com de processos estretament relacionats amb la funcionalitat d'aquest sistema, com les dinàmiques axonals o els trastorns neurodegeneratius (Alemany *et al.*, 2015). Per altra banda, en una anàlisi de variacions en el número de còpies (CNV) a escala genòmica, es va identificar el gen *PARK2* com a bon candidat a participar en la susceptibilitat a desenvolupar TDAH (Jarick *et al.*, 2014). Aquest gen, implicat en el neurodesenvolupament, codifica per a un dels components enzimàtics d'un complex E3 ubiquitina-ligasa, i ja havia estat detectat prèviament en un altre estudi de CNVs a escala genòmica en subjectes

amb TDAH (Elia *et al.*, 2010). Tenint present que el gen *FBXO33* codifica pel component de reconeixement de substrat d'un complex E3 ubiquitina-ligasa, i que el gen *RNF122* codifica directament per a un enzim E3 ubiquitina-ligasa amb domini dit-anell, la identificació dels gens *FBXO33*, *RNF122*, i *PARK2* en el TDAH suggereix que l'alteració del procés de reconeixement i marcatge de proteïnes per ubiquitinació, mediat per enzims o complexos E3 ubiquitina-ligasa, podria formar part dels mecanismes fisiopatològics potencialment implicats en el trastorn.

Aquesta hipòtesi es veu recolzada pels resultats de les anàlisis de eQTLs i d'expressió aquí presentades. Per una banda, algunes de les variants de risc per TDAH identificades al *locus* del gen *FBXO33* es correlacionaven amb un menor nivell d'expressió del gen o amb un menor volum de la matèria grisa en el gir post-central esquerra, una regió implicada en la xarxa de l'atenció i en el processament motor. Aquests resultats concorden amb estudis previs que sostenen que la reducció de l'activitat catabòlica del sistema ubiquitina-proteosoma pot resultar en un nivell de renovació proteica insuficient i en l'acumulació de proteïnes defectuoses, amb una estabilitat anormal, i la formació de complexos tòxics per la cèl·lula. Múltiples estudis han detectat menors nivells d'expressió de les proteïnes que integren aquest sistema tant en malalties neurodegeneratives com en certes condicions psiquiàtriques, sobretot en el cas de l'esquizofrènia i el trastorn bipolar (Scott *et al.*, 2016; Ryan *et al.*, 2006; Bousman *et al.*, 2010b; Rubio *et al.*, 2013; Dennissen *et al.*, 2012; Schmidt i Finley, 2014; Dantuma i Bott, 2014). Per altra banda, també s'han descrit augments en els nivells o l'activitat de les proteïnes implicades en la ubiquitinació en alguns trastorns psiquiàtrics (Crider *et al.*, 2014; Pandya *et al.*, 2014; Dantuma i Bott, 2014). L'increment de la ubiquitinació, i el conseqüent augment de la degradació proteica, podria comprometre la funcionalitat neuronal a través de la desregulació del recanvi de proteïnes integrals de la membrana plasmàtica, sobretot tenint present el paper del sistema ubiquitina-proteosoma en la regulació de les proteïnes d'ancoratge i els receptors de neurotransmissors, com ara els receptors de l'àcid gamma-aminobutíric (GABA), els receptors de glutamat ionotòpics Àcid Propiònic α -Amino-3-Hidroxi-5-Metil-4-Isoxazol (AMPA) i N-Metil-D-Aspartat (NMDA), els receptors de dopamina o els receptor colinèrgics nicotínics (Hegde AN, 2010 i 2017; Lin i Man, 2013). Aquestes evidències concorden amb els resultats de l'anàlisi d'expressió del gen *RNF122*, on es va observar una sobre-expressió d'aquesta E3 ubiquitina-ligasa en PBMCs d'adults amb TDAH.

Adicionalment, els resultats de les anàlisis d'enriquiment de funcions i vies de senyalització, realitzades amb les dades dels estudis GWAS aquí presentats, també recolzen el paper d'aquest sistema en el TDAH. En l'estudi GWAS basat en SNPs es va detectar directament enriquiment de gens

implicats en el sistema ubiquitina-proteosoma, mentre que a través del disseny basat en gens, es va identificar una sobre-representació de gens implicats a les vies de senyalització de la proteïna quinasa A (PKA) i de l'adenosina monofosfat cíclic (AMPc), dos processos que participen en la plasticitat sinàptica de l'adult mediada pel sistema ubiquitina-proteosoma (Hegde AN, 2017).

Per últim, en l'estudi GWAS basat en gens, es van identificar diversos gens implicats en diferents processos de transport vesicular associats a la ubiquitinació, el que s'afegiria a les evidències que recolzen la participació del sistema ubiquitina-proteosoma i el tràfic intracel·lular en el TDAH (Taula 9). Entre ells, destacarien: (1) el gen *CTAGE5* i el gen amb activitat inhibidora de melanoma 2 (*MIA2*), ambdós implicats en el transport de càrregues molt grans des del RE al Golgi en vesícules amb cobertura COPII, que necessiten de la ubiquitinació per tal d'adaptar la seva mida; (2) el gen que codifica per la subunitat alfa del complex proteic del coatòmer (*COPA*), que s'associa de forma reversible a les vesícules sense cobertura de clatrina que medien el transport de les proteïnes biosintetitzades des del RE al Golgi; (3) el gen que codifica per l'espantina (*SPAST*), una ATPasa implicada en el tràfic des del RE al Golgi i en el reciclatge dels endosomes, així com en la motilitat intracel·lular, el plegament de les proteïnes i la proteòlisi; i, finalment, (4) el gen interactor de Ras i Rab 2 (*RIN2*), que interacciona amb la proteïna de la família oncogènica RAS membre 5B (*RAB5B*) i participa en el tràfic vesicular en la via endocítica (Saito *et al.*, 2002). Tots ells han estat associats a diversos trastorns psiquiàtrics, incloent simptomatologia pròpia del TDAH (Taula 9).

En resum, aquest conjunt de resultats sembla indicar que l'alteració de la regulació del tràfic vesicular i de processos de catabolisme proteic intracel·lulars com la degradació mediada pel sistema ubiquitina-proteosoma, podria explicar part de base etiopatogènica del TDAH. Aquestes dades posen en evidència la necessitat de realitzar estudis més exhaustius per a definir el rol exacte d'aquests mecanismes en la susceptibilitat a desenvolupar el trastorn.

1.3. Regulació recíproca entre el sistema ubiquitina-proteosoma i els microARNs

Les evidències aportades pels estudis realitzats en el marc d'aquesta Tesi Doctoral recolzen el paper dels microARNs i de la via ubiquitina-proteosoma en la susceptibilitat a desenvolupar TDAH. Ambdós sistemes tenen com a objectiu comú l'estrict control espacial i temporal dels nivells proteics, per tal d'assegurar l'homeòstasi cel·lular. En conseqüència, donat que tant la maquinària implicada en l'expressió, maduració i funció dels microARNs, com els propis components de la via ubiquitina-

proteosoma, són de caràcter proteic, resulta evident que aquests dos sistemes interaccionen entre ells i exerceixen funcions reguladores recíproques.

Per una banda, diversos estudis revelen que certs components de la regulació mediada per microARNs, com les proteïnes argonauta (AGO), l'endonucleasa Dicer o diversos elements del complex miRISC, es troben sota el control de la ubiquitinació, i de la degradació mediada pel proteosoma o l'autofàgia. Per exemple, s'ha descrit que algunes proteïnes de la família multi-domini tripartit (TRIM), que contenen un domini dit-anell amb activitat E3 ubiquitina-ligasa, regularien l'activitat dels microARNs mitjançant la ubiquitinació de diverses proteïnes del complex miRISC, conduint a la seva degradació per acció del proteosoma o bé a la potenciació de la seva activitat (Derrien *et al.*, 2014; Rybak *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2014b; Wulczyn *et al.*, 2011; Siomi i Siomi, 2010; Pasquinelli AE, 2012). És important destacar que s'han identificat variants associades al TDAH en alguns d'aquests gens, com ara *TRIM71* (mLin41), que ubiquitina la proteïna AGO2 i modula principalment els nivells de let-7 -que també s'ha trobat associat a TDAH-, o *TRIM32*, que està inclòs en CNVs de la regió 9q33.1, que s'han detectat en individus amb trastorns del neurodesenvolupament, incloent TDAH (Rybak *et al.*, 2009; Lionel *et al.*, 2014).

Per altra banda, els microARNs també regulen el sistema ubiquitina-proteosoma, i l'alteració d'aquest control s'ha vist associat al desenvolupament de malalties neurològiques. En atàxia espinocerebel·lar tipus 1, així com en un model animal de malaltia priònica neurodegenerativa, es va detectar que moltes de les dianes dels microARNs alterats en aquests fenotips formaven part del sistema ubiquitina-proteosoma (Saba *et al.*, 2008; Smrt *et al.*, 2010). En un estudi sobre el control de la maduració neuronal, es va suggerir que el paper que exerceix el miR-137 en aquest procés estaria mediat per la regulació de la ubiquitina-ligasa bomba mental 1 (Mib1) (Persengiev *et al.*, 2012). Finalment, en malaltia d'Alzheimer, s'ha proposat que una sobre-expressió del miR-7 causaria una disminució dels nivells de l'enzim conjugador d'ubiquitina E2A (UB2A) i conduiria a un augment dels dipòsits d'amiloide (Zhao *et al.*, 2016b).

Els resultats obtinguts pels estudis aquí presentats també recolzen aquest diàleg entre els microARNs i el sistema ubiquitina-proteosoma en el TDAH. En un estudi de la malaltia de Parkinson, es va reportar que el miR-34b i el miR-34c podrien estar regulant de manera directa o indirecta la proteïna parkina, codificada pel gen *PARK2*, que -com s'ha comentat anteriorment- es va trobar associat a TDAH en un estudi previ (Miñones-Moyano *et al.*, 2011). Per altra banda, alguns dels microARNs que han mostrat associació amb el trastorn en els estudis aquí presentats, tenen com a dianes experimentalment

validades o predites els gens *FBXO33* i/o *RNF122*, segons les dades disponibles a les bases de dades TarBase i TargetScan (Vlachos *et al.*, 2015; Agarwal *et al.*, 2015) (Taula 10).

Taula 10. Interaccions ARNm-microARN descrites per TarBase i TargetScan considerant els microARNs identificats en els estudis d'associació i els gens *FBXO33* i *RNF122*.

TarBase: Evidències experimentals validades			TargetScan: Prediccions		
microARN	Gen	Mètode	microARN	Gen	Posició a 3' UTR
hsa-let-7b-5p	<i>FBXO33</i>	Immunoprecipitació	hsa-let-7a-3p	<i>FBXO33</i>	563-569, 1780-1786, 1838-1844
hsa-miR-34b-3p	<i>FBXO33</i>	Immunoprecipitació	hsa-let-7b-3p	<i>FBXO33</i>	563-569, 1780-1786, 1838-1844
hsa-miR-128	<i>FBXO33</i>	Immunoprecipitació	hsa-let-7f-1-3p	<i>FBXO33</i>	563-569, 1780-1786, 1838-1844
hsa-miR-182-5p	<i>RNF122</i>	Biotina	hsa-miR-96-5p	<i>FBXO33</i>	867-873
hsa-miR-182-5p	<i>FBXO33</i>	Immunoprecipitació	hsa-miR-128-3p	<i>FBXO33</i>	1075-1082
			hsa-miR-182-5p	<i>FBXO33</i>	867-873
			hsa-miR-183-3p	<i>FBXO33</i>	3317-3323
			hsa-miR-183-5p	<i>RNF122</i>	161-167
			hsa-miR-371b-5p	<i>FBXO33</i>	1891-1897
			hsa-miR-373-5p	<i>FBXO33</i>	1891-1897

2. Consideracions sobre la metodologia emprada

En l'abordatge de la complexitat etiològica del TDAH, l'estratègia més àmpliament utilitzada i la que ha reportat millors resultats ha estat la realització d'estudis d'associació cas-control poblacionals. En aquesta Tesi Doctoral s'ha optat per aplicar aquesta metodologia a l'hora d'identificar factors de risc genètics implicats en la susceptibilitat a desenvolupar TDAH. Donada la complexitat d'aquest trastorn, amb múltiples factors de risc exercint un efecte de lleu a moderat en la seva vulnerabilitat, és crucial tenir present una sèrie de consideracions en el disseny d'aquests estudis, per tal de maximitzar la seva capacitat de detectar els factors etiològics implicats.

2.1. Mostra d'estudi

2.1.1. Selecció de subjectes amb TDAH i poder estadístic

A l'hora d'identificar o caracteritzar l'efecte d'un determinat factor de risc sobre un fenotip concret, cal dissenyar un estudi que maximitzi l'èxit i permeti una anàlisi estadística el més informativa possible, alhora que redueixi la inversió de recursos. El poder estadístic i, en conseqüència, la mida de la mostra, així com el fenotipatge dels individus, són els paràmetres més importants a tenir en compte en l'assoliment d'aquests objectius. El **poder estadístic** es pot entendre com la probabilitat de rebutjar l'hipòtesi nul·la quan la hipòtesi alternativa és certa, i està afectat per múltiples variables, com ara la prevalença del fenotip estudiat, la mida de l'efecte dels factors de risc estudiats o la mida mostral. Es defineix com a **mida mostral efectiva** aquell número mínim de mostres que permet assolir un poder estadístic adequat i que, per tant, permet detectar evidències d'associació certes entre els paràmetres avaluats. Així, tot i que en ocasions no sigui necessària una mostra extremadament gran, una mida massa petita pot impedir la detecció d'associacions certes i afavorir els falsos negatius, com a conseqüència de l'efecte de factors que causen biaix sistemàtic i que condueixen a la reducció del poder estadístic. Sovint, s'ha utilitzat un valor de poder estadístic del 80% per minimitzar les associacions negatives falses, alhora que per determinar una mida mostral que maximitzi el cost-efectivitat de l'estudi. Per a donar una idea, una mostra de 1.000 casos i 1.000 controls tindria un poder estadístic del 80% per a detectar variants genètiques amb una MAF de 0,10 i una raó d'avantatges (OR) de 1,5. Per al càlcul del poder estadístic de les mostres emprades en els estudis genètics d'associació

aquí presentats, s'han emprat dues plataformes informàtiques: per una banda, el programa *Genetic Power Calculator* (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc/>), i per una altra banda, el programa *Power Calculator for Two Stage Association Studies* (CaTS, <http://csg.sph.umich.edu/abecasis/CaTS/index.html>).

En el marc d'aquesta Tesi Doctoral, no sempre s'ha disposat de la mida mostral necessària per a garantir un elevat poder estadístic. Per aquesta raó, per tal de minimitzar l'existència de falsos negatius i augmentar la capacitat de detectar associacions vertaderes, s'ha maximitzat l'homogeneïtat dels grups considerats a través de l'aplicació de diverses estratègies. La reducció de l'**heterogeneïtat fenotípica**, i la conseqüent reducció de l'**heterogeneïtat genètica** de les mostres considerades en aquests estudis, ha fet possible la identificació de factors de risc genètics i d'expressió implicats en el TDAH.

Per una banda, l'avaluació clínica dels individus inclosos a la mostra de TDAH s'ha basat en un diagnòstic estructurat i exhaustiu, fonamentat en la realització de diversos tests i entrevistes basats en els criteris del DSM-IV, i s'ha dut a terme pel mateix equip clínic, ubicat a l'Hospital Universitari de la Vall d'Hebron (Barcelona). Tots els subjectes reclutats són d'origen espanyol i d'ascendència europea. A l'hora de definir els grups, s'han tingut presents aspectes com els diferents subtipus clínics del trastorn (inatent, hiperactiu/impulsiu o combinat), la diferenciació entre TDAH infantil i la forma persistent en l'adult o la presència de comorbiditat, ja que s'ha descrit que la base genètica de susceptibilitat subjacent a cadascuna d'aquestes presentacions seria diferent. Per tant, considerar-les de forma conjunta podria contribuir a l'heterogeneïtat de la mostra, la reducció del poder estadístic i la detecció d'associacions negatives falses. En aquest sentit, en l'estudi d'associació del grup miR-34b/c i el TDAH, la proporció de la variança explicada per totes les variants genètiques identificades ha estat superior en la mostra de TDAH combinat que en la mostra total; i moltes de les associacions detectades han resultat més significatives en el grup de TDAH combinat en comparació amb la mostra global -tot i la disminució de la mida mostral-. Addicionalment, tant en aquest estudi com en l'anàlisi del gen *FBXO33* -on s'ha detectat l'associació en la mostra de TDAH global i en el subtipus combinat-, no es van identificar variants de risc considerant el grup de TDAH inatent. Aquests resultats estan en línia amb estudis previs que recolzen l'existència d'un component genètic específic subjacent a les diferents presentacions del trastorn, i amb les dades que donen suport a la validesa i utilitat clínica de la distinció dels dominis simptomàtics del TDAH reflectits a partir del DSM-IV, en base a l'existència d'alteracions funcionals i substrats neurals diferenciats entre els diferents subtipus (American Psychiatric Association, 1994; American Psychiatric Association, 2013; Willcutt *et al.* 2012; Fair *et al.*, 2013). No obstant, no es pot

descartar que la falta de resultats positius en el grup de TDAH inatent sigui conseqüència d'una falta de poder estadístic derivada de la limitada mida mostral. Per exemple, en el cas de l'estudi del grup miR-34b/c i les seves dianes, el poder estadístic de la mostra de TDAH inatent era només del 20% per a detectar variants amb una OR de 1,2 i una MAF de 0,10.

Pel que fa a les diferències entre el TDAH infantil i adult, en els estudis que formen part d'aquesta Tesi Doctoral, s'ha optat per treballar només amb subjectes adults amb el trastorn, ja que això comporta una reducció de l'heterogeneïtat genètica de la mostra, en comparació amb els grups que consideren TDAH infantil, on s'inclouen tant aquells individus predisposats a la forma remissiva del trastorn, com aquells que presenten la base genètica que els fa susceptibles a desenvolupar la forma persistent.

Per altra banda, un altre dels factors més importants que contribueix a l'heterogeneïtat fenotípica i genètica del TDAH és la seva elevada **comorbiditat** amb altres trastorns psiquiàtrics. Per aquesta raó, tot i que es tracta d'una variable difícil de controlar, s'ha tractat de reduir la seva influència en els estudis aquí presentats. Per exemple, en els criteris d'exclusió aplicats en la mostra de TDAH, s'inclou: un coeficient d'intel·ligència inferior a 70; presència d'esquizofrènia o altres trastorns psicòtics; presència de símptomes de TDAH deguts a trastorns de la personalitat, trastorns dissociatius, ansietat o trastorns de l'ànim; adopció; abús físic o sexual; pes al néixer inferior a 1,5 kg; o presència d'altres trastorns neurològics o sistèmics que puguin explicar la simptomatologia del trastorn. No obstant, una part dels subjectes considerats en els estudis aquí reportats presenten comorbiditat amb SUD o amb trastorns disruptius del comportament, com ara trastorn oposicional desafiant o trastorn de la conducta, fet que contribueix a l'heterogeneïtat a la mostra. La necessitat de tenir en compte els perfils de comorbiditat dels subjectes amb TDAH s'ha fet evident sobretot en l'estudi del grup miR-183-96-182 i la seva diana *HTR1B*, on s'ha identificat una associació específica entre aquest grup de microARNs i el TDAH sense SUD, i el TDAH sense SUD ni trastorns disruptius del comportament. Aquesta associació no s'ha replicat en considerar les mostres de subjectes amb SUD -amb o sense TDAH-, o de subjectes amb TDAH i trastorns disruptius del comportament. Aquests resultats, en línia amb estudis previs, suggereixen l'existència d'una base genètica de risc diferenciada implicada en el desenvolupament del TDAH amb o sense aquestes comorbiditats (Carpentier *et al.*, 2013). Tot i això, no es pot descartar per complet que les discrepàncies observades puguin ser degudes a una falta de poder estadístic (40% en la mostra total de TDAH en aquest estudi), o a la presència d'altres trastorns comòrbids no considerats amb una distribució de freqüències diferent entre les mostres.

La importància d'un bon fenotipatge i de la distinció de cadascuna de les formes de presentació del TDAH, es fa encara més important en els estudis dels perfils d'expressió gènica, ja que aquests són molt susceptibles a l'efecte dels factors ambientals. Per aquesta raó, els individus inclosos en els estudis d'expressió aquí presentats no han rebut mai cap tractament farmacològic pel TDAH, ni presenten comorbiditats psiquiàtriques -pel que tampoc se'ls ha administrat cap altre psicofàrmac-. Aquesta estratègia, malgrat la dificultat que comporta en el reclutament i l'assoliment de la mida mostral necessària, ha permès la detecció d'una sobre-expressió del miR-34c i del gen *RNF122* en subjectes adults amb TDAH en comparació amb controls sans.

Així mateix, tot i els esforços per maximitzar l'homogeneïtat de la mostra i afavorir la identificació de factors de risc implicats en el TDAH, la falta de poder estadístic pot haver condicionat l'èxit d'alguns dels estudis d'associació realitzats. Per exemple, podria explicar la falta d'associació entre el TDAH i la variant rs4938723 del pri-miR-34b/c, tot i haver demostrat el seu comportament com a *cis*-eQTL d'ambdós microARNs (poder estadístic 36%, 27%, 20% en la mostra global, combinada i inatenta, respectivament), o podria haver condicionat els resultats de l'estudi d'expressió del miR-34b, impedit que les diferències observades arribessin a ser significatives. Així mateix, podria donar explicació a l'absència de senyals per sota del llindar de significació genòmica (P -valor $<1,7e-08$) considerat en els estudis GWAS aquí presentats, ja que aquests dissenys són encara més susceptibles a la falta de poder estadístic degut a l'elevat nombre de tests que es realitzen, i requereixen mides mostrals molt més grans per assolir el poder estadístic adequat. Per exemple, en un estudi es va estimar que per tal d'assolir un poder estadístic del 80% per avaluar 500,000 variants o 1 milió de variants, assumint un OR de 2, una prevalença de la malaltia del 5%, una MAF del 5%, LD complet, un ratio cas-control 1:1 i una raó d'error del 5% en el test al·lèlic, eren necessàries unes mides mostrals de 1.206 i 1.255 casos, respectivament (Hong i Park, 2012).

2.1.2. Selecció de la mostra control i estratificació poblacional

En els estudis d'associació de tipus cas-control poblacional, com a grup control s'utilitzen individus no relacionats entre ells ni amb els pacients. L'elecció adequada de la població control és crucial per tal de maximitzar l'èxit en aquest tipus d'aproximacions.

Per una banda, és important descartar el fenotip d'estudi en la mostra de controls, ja que en cas contrari, es pot produir un emmascarament dels resultats i una pèrdua de poder estadístic per a detectar

associacions vertaderes, sobretot si es tracta d'un trastorn prevalent en la població general. És a dir, es poden afavorir els **falsos negatius** (errors de tipus β). Els subjectes control inclosos en els estudis aquí presentats, van ser entrevistats per tal de descartar aquells que presentaven història personal o familiar de primer grau de TDAH, o amb simptomatologia atribuïble al trastorn.

Per altra banda, el grup control ha de constituir una mostra representativa de la població base de la que es van seleccionar els casos i idealment hauria de ser similar a aquesta en totes les variables excepte en el fenotip d'estudi. En cas de no ser així, les diferències existents entre ambdós grups podrien conduir a la presència de **falsos positius** (errors de tipus α). Per exemple, la presència de diferències en les freqüències genotípiques, al·lèliques o haplotípiques entre els grups que es comparen, pot comportar la identificació d'associacions positives falses (Figura 13). Aquest fenomen es coneix com a **estratificació poblacional** i pot ser resultat de fenòmens migratoris històrics. Així mateix, tenir en compte la **distribució de sexes** en els grups d'estudi resulta d'especial importància en trastorns com el TDAH, on la proporció d'individus afectats varia considerablement en funció del sexe (2,4:1 i 4:1, nen:nena; 1:1 i 3:1, home:dona) (Polanczyk *et al.*, 2007; Matte *et al.*, 2015). En conseqüència, els grups de casos i controls considerats en els estudis aquí presentats s'han aparellat sempre per sexe i origen ètnic, sent tots els subjectes control d'origen espanyol i d'ascendència europea. Addicionalment, l'absència de subestructures poblacionals havia estat confirmada prèviament en un subgrup de 188 adults amb TDAH i 400 controls de la mostra total inclosa en aquests estudis, mitjançant la genotipació de 48 SNPs intergènics independents, localitzats a una distància mínima de 100 Kb de qualsevol gen conegut, i aplicant tres metodologies estadístiques diferents (Ribasés *et al.*, 2009a).

2.2. Correccions per múltiples tests estadístics

Cada vegada que es realitza un test, existeix certa probabilitat d'obtenir un determinat resultat com a producte de l'atzar, i de donar per vàlida la hipòtesi alternativa quan, en realitat, la hipòtesi nul·la és certa. Generalment, s'accepta una probabilitat màxima de falsos positius del 5%. Per aquesta raó, quan es duen a terme múltiples tests estadístics de forma simultània, cadascun amb una probabilitat associada de detectar associacions falses, augmenta la probabilitat d'obtenir falsos positius. Degut a que en els darrers anys, tant en els estudis d'associació genètics com en les anàlisis dels perfils d'expressió, la tendència és a incrementar el número de variants o gens avaluats, la problemàtica associada a la realització de múltiples tests ha anat guanyant importància. Per tal de controlar aquest

fenomen, cal establir llindars de significació més restrictius que corregeixin pel número de tests realitzats. El fracàs en el control d'aquest fenomen pot tenir importants conseqüències en les conclusions extrems d'un estudi. Actualment, no existeix una aproximació acceptada universalment. A continuació es descriuen algunes de les aproximacions més aplicades i que han estat considerades en els treballs que es presenten.

Correcció de Bonferroni. És simple i molt rigorosa, i esdevé molt efectiva en el control dels falsos positius, tot i que sovint també resulta molt conservadora, ja que imposa que els tests siguin independents entre ells. Aquesta aproximació estableix un nou llindar de significació α' en funció del número n de tests realitzats, tal que $\alpha' = \alpha/n$, on α correspon al llindar de significació nominal per a un únic test (habitualment, $\alpha=0.05$) (Sham i Purcell, 2014). Per tant, assegura que la probabilitat de detectar falsos positius en cadascun dels tests independents és inferior al 5%. La limitació més important d'aquesta correcció és que sovint es desconeix el número real de tests completament independents que es contrasten, o bé, el grau d'independència entre cadascun d'ells no és total i, per tant, la seva aplicació resulta massa astringent i afavoreix l'aparició de falsos negatius. En els estudis d'associació genètics aquí presentats, els SNPs analitzats s'havien seleccionat en base a un llindar màxim de LD de 0,80 ó 0,85, i per tant, no es pot assegurar la completa independència entre ells. Per aquesta raó, l'aplicació de la correcció de Bonferroni en aquests estudis pot haver estat massa restrictiva i podria explicar perquè, en diverses ocasions, les associacions detectades no van superar el llindar de significació corregit. Per exemple, en l'estudi del grup miR-183-95-182 i la seva diana *HTR1B*, cap de les associacions detectades va superar el llindar de correcció de Bonferroni per comparacions múltiples. De la mateixa manera, en les anàlisis d'expressió amb *microarrays* dels 33 gens que havien mostrat associació suggestiva amb el TDAH en l'estudi GWAS basat en gens, no es van detectar senyals que superessin el llindar de significació corregit per Bonferroni. No obstant, aquesta aproximació sí que va permetre detectar dues variants en el *locus* del gen *FBXO33* significativament associades amb el TDAH, així com una variant addicional que actuava com a *cis*-eQTL per aquest gen. La correcció de Bonferroni també es va aplicar en l'estudi GWAS basat en gens considerant TDAH persistent i va permetre identificar una associació estadísticament significativa entre el gen *CTAGE5* i el trastorn, superant el llindar de significació corregit pels 17.787 gens autosòmics considerats i l'ús de dues estratègies. Per últim, la correcció de Bonferroni també es va aplicar en les anàlisis d'expressió amb PCR quantitativa a temps real (RTqPCR) i va permetre detectar diferències d'expressió estadísticament significatives pel que fa al miR-34b i el gen *RNF122* entre subjectes amb TDAH i controls sans.

Raó de falsos descobriments (FDR). Aquesta aproximació permet calcular la proporció d'hipòtesis nul·les rebutjades erròniament d'entre totes les hipòtesis nul·les rebutjades; és a dir, la proporció de falsos positius existents entre tots els resultats positius obtinguts en un estudi. Aquesta estratègia permet a l'investigador decidir el percentatge que vol tolerar d'associacions positives que són, en realitat, falses. En general, aquesta correcció té un major poder estadístic que l'anterior, però alhora pot comportar una major proporció del falsos positius.

En els estudis aquí presentats, s'han aplicat diferents algorismes de FDR, en funció dels programes utilitzats. Per exemple, en els estudis d'enriquiment de categories funcionals i vies de senyalització, així com en les anàlisis de eQTLs, el procediment de FDR implementat correspon a la seva primera definició (Benjamini i Hochberg, 1995). Per contra, en les anàlisis de marcador únic del grup miR-34b/c, és va aplicar un procediment més recent de FDR, en el que es millora el poder estadístic de l'aproximació (Storey JD, 2002 i 2003). L'aplicació d'aquests mètodes de correcció va permetre detectar associacions genètiques que no s'haguessin pogut identificar en cas d'haver aplicat la correcció de Bonferroni, com és el cas de l'associació entre el grup miR-34b/c i el TDAH, o l'enriquiment de les vies de senyalització canòniques de la PKA i l'AMPc.

Correccions per permutacions. Es tracta d'una estratègia robusta però computacionalment exigent, que pot ser aplicada quan els tests són dependents. Consisteix en calcular els valors de significació de cadascun dels tests, mitjançant la reassignació aleatòria del fenotip -el que assegura que la hipòtesi alternativa es manté certa, ja que no pot existir cap relació entre el fenotip i la variable d'estudi-. El procediment es repeteix múltiples vegades i es construeix una distribució de la freqüència empírica dels valors de P més significatius de cada permutació. El valor de P calculat amb les dades reals es compara amb aquesta distribució per tal de determinar el valor de P ajustat empíric (Sham i Purcell, 2014).

En les anàlisis d'haplotips realitzades aquí, així com en l'anàlisi basat en grups de gens implementat al programa MAGMA (*Generalized Gene-Set Analysis of GWAS Data*; <http://ctg.cncr.nl/software/magma>) s'ha aplicat aquesta estratègia per a corregir per múltiples comparacions, realitzant 10.000 permutacions. Aplicant aquesta estratègia, es va identificar l'associació significativa entre el TDAH i una combinació haplotípica de dues variants genètiques ubicades al *locus* del miR-96, així com l'associació entre el trastorn i els dos grups de gens identificats mitjançant l'estudi GWAS basat en gens.

Finalment, en cas d'optar per l'aproximació més estricta en la correcció del nivell de significació per múltiples comparacions, caldria considerar alhora tots els tests contrastats en els estudis presentats

aquí, ja que s'han basat, pràcticament, en la mateixa població. En aquest cas, cap de les associacions identificades mantindria la seva associació amb el fenotip avaluat.

2.3. Estudis de rèplica

Per tal d'assegurar la fiabilitat dels resultats experimentals obtinguts en un estudi, així com d'incrementar el seu poder explicatiu i de generalització, és necessari dur a terme estudis de rèplica on avaluar en altres grups poblacionals els resultats significatius obtinguts en l'anàlisi original. Els estudis de rèplica permeten contrastar la probabilitat d'haver detectat falsos negatius o falsos positius en l'estudi original com a resultat de, per exemple, una selecció esbiaixada i no representativa de la mostra d'estudi, o degut a una falta de poder estadístic. Així mateix, permeten un control més efectiu de la influència de variables confusores no previstes. Per tal de dur a terme un estudi de rèplica de forma adequada, cal que la mostra acompleixi al màxim una sèrie de característiques. Cal que la mostra sigui independent de l'original, i prou gran com per assolir el poder estadístic necessari per a detectar factors de risc d'efecte limitat –que correspon a la gran majoria en els trastorns complexos-. Es recomana que el poder estadístic del grup de rèplica sigui igual o superior al de l'original. Addicionalment, també és important minimitzar l'heterogeneïtat entre les poblacions i assegurar que el fenotip avaluat sigui el més semblant possible. Per últim, en cas d'analitzar polimorfismes, cal que aquests siguin els mateixos, o bé que presentin un elevat grau de LD amb els originals -amb valors de r^2 propers a 1-. En concret, en els estudis genètics d'associació, es considera com a una bona rèplica la detecció dels mateixos polimorfismes associats amb el fenotip d'interès, mantenint la direcció de l'efecte dels al·lels de risc en com a mínim una segona població. Malauradament, els resultats dels estudis de rèplica sovint mostren inconsistències o són contradictoris als originals, probablement com a conseqüència de l'heterogeneïtat dels dissenys experimentals o les metodologies aplicades, de les diferències fenotípiques de les mostres (en el cas del TDAH, diferents subtipus clínics, proporcions de comorbiditats, distribucions de gènere, etc.), de la falta de poder estadístic o de les diferències en la base genètica subjacent de cada població, amb diferents contribucions dels polimorfismes estudiats a la susceptibilitat del trastorn. En aquest darrer cas, s'ha reportat que l'absència de rèplica en un percentatge significatiu dels estudis d'associació genètics es podria explicar per l'existència de variants genètiques amb efectes biològics divergents en funció de la població (Salas i Carracedo, 2007). Addicionalment, la selecció de polimorfismes etiqueta en base a criteris de cobertura genètica en una població determinada, podria no ser representativa de la variabilitat genètica en una altra població, tot i que s'ha reportat que la seva

transferibilitat seria adequada entre poblacions d'origen comú (Balding DJ, 2006). Per últim, també s'ha proposat que, en part, la falta de rèplica de resultats positius en l'àmbit dels trastorns complexos podria ser deguda a la presència d'efectes epistàtics entre les variants identificades o entre aquestes i factors ambientals (Ma *et al.*, 2013; Mackay TF, 2014).

En el marc d'aquesta Tesi Doctoral, s'han realitzat dos estudis de rèplica. L'estudi GWAS basat en SNPs, es va replicar en tres poblacions europees (Alemanya, Noruega i Holanda), corresponents a tres nodes de la Col·laboració Multi-Cèntrica Internacional del TDAH Persistent (IMpACT - *International Multi-centre persistent ADHD CollaboraTion*; <http://www.impactadhdgenomics.com>). De les 15 variants avaluades, dues van mostrar associació amb el TDAH (una en el *locus* del gen *PEX19* en la mostra noruega i una altra en el *locus* del gen *DDYNLRB2* en la mostra alemanya), amb una mida d'efecte consistent i mantenint la direcció de l'al·lel de risc identificat a la població original. Pel que fa a la rèplica considerant els resultats del GWAS basat en gens, es van analitzar les dades de la metanàlisi de GWAS en TDAH realitzada en el marc del Consorci PGC (Neale *et al.*, 2010) i es va detectar associació nominal entre el TDAH i els gens *FBXO33* i *C15orf53*.

Adicionalment, cap dels resultats reportats aquí mostren solapament amb les associacions identificades en altres estudis GWAS en TDAH o amb gens candidats clàssicament associats al trastorn. Probablement, la presència de diferències en factors com el coeficient intel·lectual, l'edat dels subjectes, les freqüències de comorbiditats o la proporció dels subtipus clínics, podrien explicar l'absència de rèplica. En aquest sentit, en la metanàlisi inclosa en aquest estudi es va explorar l'heterogeneïtat interpoblacional mitjançant l'**estadístic Q**, i es va confirmar la presència de cert nivell d'heterogeneïtat considerant les tres poblacions europees, pel que enlloc d'estimar la mitjana dels ORs en un model d'efectes fixos, es aplicà un model d'efectes aleatoris per a calcular l'efecte real de les variants.

No obstant, en la majoria de les anàlisis aquí presentades, no s'han realitzat estudis de rèplica dels resultats obtinguts i, per tant, no es pot descartar que l'atzar hagi condicionat els resultats. Per tal de determinar de forma més consistent el paper dels gens i microARNs identificats en el TDAH, així com en altres trastorns psiquiàtrics amb els que comparteix part de l'heretabilitat, és necessari realitzar estudis de rèplica addicionals en mostres independents. Donada la limitada mida de la mostra, la necessitat de rèplica és fa especialment evident en les anàlisis d'expressió gènica o de microARNs presentades.

2.4. Consideracions en els estudis genètics d'associació cas-control poblacionals

2.4.1. Selecció de gens i regions candidates

Com s'ha detallat en apartats previs d'aquest treball de Tesi Doctoral, inicialment, l'abordatge genètic del TDAH mitjançant estudis d'associació s'havia fonamentat en la selecció de **gens i regions candidates**. Aquesta aproximació es basa en l'existència d'una hipòtesi prèvia sobre la possible implicació en el trastorn d'aquests factors, fonamentada en evidències clíniques, farmacològiques, fisiològiques, bioquímiques o genètiques que suggereixin un lligam molecular, funcional o biològic amb la condició d'estudi. Mitjançant aquest abordatge, s'han aportat evidències sobre la implicació de més d'un centenar de gens en el trastorn -alguns dels quals, demostrant una associació ferma-, i s'han identificat vies i sistemes probablement implicades en la seva etiologia. Així mateix, s'ha pogut definir el paper de certs factors genètics en la seva comorbiditat amb altres trastorns psiquiàtrics i somàtics, i s'ha descrit la importància de les correlacions i interaccions gen*ambient en la seva etiologia (Kendler KS, 2013; Li *et al.*, 2014a; Hawi *et al.*, 2015). En aquest treball de Tesi Doctoral, aquesta metodologia ha permès identificar per primera vegada l'associació entre el TDAH i els microARNs miR-183-96-182 i miR-34b/c, així com algunes de les seves dianes validades de regulació, com el gen *HTR1B* i els gens *MET*, *NOTCH2* i *HMGA2*, respectivament.

Alhora, els resultats previs obtinguts a través d'aquestes metodologies han demostrat certes inconsistències. El nivell d'associació dels marcadors identificats varia substancialment en funció de l'estudi i en molts casos no s'han pogut replicar els resultats; els efectes de les variants identificades és baix o moderat, i aquestes només expliquen una petita part de l'heretabilitat associada al trastorn. A més, les aproximacions basades en la selecció d'un número limitat de gens candidats en funció d'una hipòtesi prèvia, depenen del coneixement disponible i són incapaces d'identificar nous gens, o combinacions d'aquests (Kendler KS, 2013; Li *et al.*, 2014a; Hawi *et al.*, 2015). Així, amb l'objectiu de superar aquestes limitacions i lligat als avenços de les tecnologies de genotipació massiva i a la disponibilitat d'informació sobre l'arquitectura genètica en panells de referència, s'ha apostat per la realització d'**estudis d'associació a escala genòmica** (GWAS), on s'han avaluat de forma sistemàtica milions de variants polimòrfiques al llarg de tot el genoma, sense restringir l'estudi a regions concretes en base a una hipòtesi prèvia. A més, aquesta estratègia s'ha complementat amb abordatges basats en gens i anàlisis d'enriquiment de funcions biològiques i vies de senyalització cel·lulars, que permeten, per una banda, detectar *loci* amb múltiples variants de significació lliandar que potser no emergirien

mitjançant l'abordatge convencional basat en SNPs; i, per altra banda, aporten informació sobre la implicació de funcions cel·lulars concretes i vies biològiques específiques en l'etiologia d'un trastorn complex. No obstant, aquestes estratègies tampoc no han resultat completament exitoses i han demostrat certes inconsistències entre els resultats reportats pels diferents estudis, fet que podria ser conseqüència de les diferències en el disseny de cada GWAS, en el fenotipatge de les mostres o en el poder estadístic. Per tant, es fa palesa la necessitat de realitzar estudis amb mostres més grans i un major poder estadístic, de seleccionar poblacions més homogènies i d'utilitzar estratègies estadístiques més complexes i elaborades. En aquest treball de Tesi Doctoral, aquesta metodologia ha permès identificar per primera vegada l'associació suggestiva entre el TDAH persistent i els gens *FBXO33*, *RNF122*, *CTAGE5* i *C15orf53*, així com la identificació del sistema ubiquitina-proteosoma com a procés candidat potencialment implicat en l'etiologia del trastorn.

2.4.2. Selecció de polimorfismes

Els marcadors genètics avaluats en els estudis d'associació poden ser **funcionalment rellevants** pel fenotip d'estudi i estar directament implicats en la seva fisiopatologia -com per exemple, si comporten un canvi d'aminoàcid, si alteren una regió d'unió a factors de transcripció en un promotor gènic o si comprometen una regió de *splicing*-, o bé poden presentar una relació indirecta amb aquest i estar en **LD** amb les variants de valor funcional (Caixa 3). La principal limitació dels estudis d'associació que avaluen variants funcionals és la disponibilitat de dades prèvies que recolzin el seu possible rol funcional en l'etiologia d'un trastorn. Existeixen múltiples bases de dades i eines bioinformàtiques de predicció funcional que empen diferents algorismes per a descriure el possible efecte d'una variant, entre els quals s'inclouen diversos recursos que s'han utilitzat en els estudis aquí presentats, com ara CFSSP (*Chou & Fasman Secondary Structure Prediction Server*), SNPinfo, TFSearch, ESEfinder, ESRSearch, RESCUE_ESE, PolymiRTS, miRNASNP, miRNASNPscore o miRSNP (Chou i Fasman, 1974; Xu i Taylor, 2009; Smith *et al.*, 2006; Cartegni *et al.*, 2003; Fairbrother *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2012). No obstant, la informació funcional disponible encara és força limitada, i la major part dels estudis que es realitzen actualment opten per seleccionar les variants en base a criteris de **cobertura genètica**. És a dir, utilitzen els patrons de LD d'una població concreta per a seleccionar les variants assegurant la màxima cobertura de la variabilitat genètica, minimitzant la redundància dels marcadors i, alhora, reduint la pèrdua d'informació. Els principals paràmetres emprats en quantificar el valor de LD entre loci són D' i r^2 , el valors dels quals varien de 0 a 1. Quan D' pren el valor $D'=1$, indica que els *loci* estan en complet LD. Quan el coeficient de correlació r^2 pren el valor de $r^2=1$, indica que dues variants es troben en

màxim desequilibri i que presenten les mateixes freqüències al·lèliques (Slatkin M, 2008). S'ha estimat que la selecció de SNPs no correlacionats, amb valors de $r^2 < 0,80$ en relació a qualsevol altre variants de l'estudi, permet reduir entre un 75 i un 90% la densitat de les variants a analitzar sense pèrdua d'informació essencial (Gu et al., 2008). Per altra banda, a l'hora de seleccionar marcadors també cal tenir en compte el valor de la MAF, ja que si és molt baixa, serà necessària una mida mostral molt gran per a poder detectar l'efecte de les variants en el fenotip d'interès. En aquest sentit, en els estudis aquí presentats s'ha treballat sota la hipòtesi "malalties comunes - variants comunes", que postula que les variants genètiques que causen les malalties complexes són comunes en la població general, amb MAFs per sobre de 0,01.

Recentment, diversos projectes han estudiat i posat a l'abast una gran quantitat d'informació sobre l'arquitectura genètica del genoma humà, incloent informació sobre les freqüències al·lèliques d'aquests marcadors i els seus patrons de desequilibri. En els estudis realitzats aquí, s'han consultat els dos projectes més importants en aquest àmbit: per una banda, la col·laboració internacional del **Projecte HapMap**, que tot i que actualment es troba en desús, durant la darrera fase va posar a disposició pública dades sobre, aproximadament, 1,6 milions de variants en 1.301 individus de 11 poblacions ancestrals diferents; per altra banda, el projecte internacional col·laboratiu dels **1000 Genomes** (1000 Genomes Project Consortium, 2015; <http://www.internationalgenome.org/>), que ha posat a l'abast dades sobre més de 84 milions de SNPs, considerant 2.504 individus de 26 poblacions diferents. L'ús de la informació d'aquests panells de referència ha permès **imputant** les dades de milions de variants i realitzar estudis d'associació molt més informatius, reduint el número de SNPs genotipats, així com la despesa econòmica associada (Halperin i Stephan, 2009).

En els estudis d'associació basats en gens o microARNs candidats aquí presentats, la selecció de SNPs es va realitzar en base a criteris de cobertura genètica, considerant valors màxims de LD de r^2 de 0,80 i 0,85, i MAFs de 0,05 a 0,1. Pel que fa a la imputació de variants en els loci dels gens *FBXO33* i *RNF122* es va definir un llindar de $MAF > 0,01$, i es va establir un llindar mínim de qualitat de la imputació $r > 0,4$.

Tot i que aquests criteris es van definir assegurant una adequada cobertura genètica, no es pot descartar la presència de variants addicionals no considerades, potencialment funcionals i implicades en el TDAH. Per exemple, caldria explorar de forma més exhaustiva la presència de polimorfismes addicionals en els loci del miR-34c i del gen *RNF122* -que es van trobar diferencialment expressats en adults amb TDAH-, donat que les variants identificades en aquestes regions i associades nominalment

amb el trastorn, no es corresponien amb aquelles que actuaven com a *cis*-eQTL dels gens corresponents. Això podria indicar l'existència d'altres variants en LD, o amb menor MAF, que no s'han considerat en l'estudi i que siguin les veritables variants funcionals associades a la regulació de l'expressió d'aquests gens i microARNs i implicades en el TDAH.

2.4.3. Errors de genotipació

Independentment de la plataforma utilitzada, el procés de genotipació és susceptible a la presència d'errors tècnics que poden condicionar de forma significativa les conclusions biològiques extretes d'un estudi (Pompanon *et al.*, 2005; Abou-Sleiman *et al.*, 2006). A diferència dels estudis d'associació familiars, en els estudis poblacionals la detecció d'aquests errors és més difícil, ja que no és factible realitzar controls mitjançant anàlisis de segregació. Donat que els estudis realitzats a l'actualitat inclouen un elevat nombre de polimorfismes i de subjectes, s'ha estimat que la presència d'errors a petita escala, independents del fenotip estudiat, no tendeix a afavorir l'aparició de falsos positius, però sí que pot comportar una pèrdua de poder estadístic. Entre les mesures més emprades habitualment en el control de la fiabilitat de la genotipació s'inclouen la incorporació de mostres duplicades, l'ús de controls interns amb genotip conegut, l'ús de controls negatius i la validació de la genotipació mitjançant una segona tècnica. Addicionalment, també es poden detectar errors durant l'anàlisi de les dades mitjançant la mesura de la desviació de les freqüències genotípiques de l'equilibri Hardy-Weinberg (HWE), ja que es postula que una elevada taxa d'errors condueix a un desequilibri significatiu. En els estudis aquí presentats, s'han aplicat les estratègies de genotipació d'individus duplicats, l'ús de mostres de genotip conegut i l'ús de controls negatius, així com l'anàlisi de l'equilibri HWE en la mostra de controls, on aquells SNPs que han mostrat una desviació significativa s'han exclòs de l'anàlisi (P -valor <0.01 estudis basats en gens i regions candidates i P -valor $<1e-06$ en estudis GWAS).

2.4.4. Estimació de les freqüències haplotípiques

En l'estudi d'associació del grup miR-183-96-182, l'anàlisi no es va restringir només a variants genètiques aïllades, sinó que també es va avaluar l'efecte de combinacions de diversos polimorfismes o **haplotips**. Per tal de reconstruir les combinacions haplotípiques dels individus analitzats, es van utilitzar mètodes estadístics en els que s'assumeix cert nivell d'incertesa, ja que en els estudis d'associació cas-control poblacionals s'utilitzen subjectes no relacionats entre ells i, per tant, no es disposa de les dades

genotípiques dels seus progenitors. L'assignació d'haplotips permet comparar la freqüència d'individus portadors de la combinació de risc entre el grup de subjectes amb el trastorn i el grup dels controls sans, així com introduir altres variables en el model, com l'edat o el subtipus clínic. L'estimació d'haplotips es pot realitzar, o bé de forma simultània, considerant casos i controls com un únic grup, el que comporta una millor estimació sota la hipòtesi de no associació, però que pot introduir biaix cap a aquesta hipòtesi i afavorir l'aparició de falsos negatius; o bé de forma separada en casos i en controls, el que pot afavorir la detecció de falsos positius (Balding DJ, 2006). En l'estudi del grup miR-183-96-182, es va optar per l'estimació d'haplotips considerant els grups de casos i controls de forma independent, ja que les variants considerades ja havien mostrat associació amb el TDAH. Aquesta estratègia va permetre identificar l'associació nominal entre el TDAH sense SUD i un haplotip format per dues variants en el *locus* del miR-183-96-182.

2.4.5. Interacció gen*gen i gen*ambient

Tot i l'elevat nombre d'estudis genètics realitzats en l'àmbit del TDAH, els *loci* de risc identificats expliquen només una petita proporció de la seva elevada heretabilitat, fenomen que s'ha denominat heretabilitat perduda. Entre les diverses hipòtesis que tracten de donar-hi resposta, alguns autors proposen que aquest fet seria resultat de no tenir en compte les **interaccions epistàtiques** entre diferents gens (gen*gen). Es defineix com a epistasi el fenomen pel qual l'efecte sobre un fenotip exercit per un al·lel en un *locus*, es veu modificat per l'efecte d'un altre al·lel en un altre *locus*, de forma multiplicativa o atenuant. Per tant, dues variants amb efectes epistàtics exerciran, combinades, un efecte no-lineal que serà diferent del l'efecte exercit per cadascuna d'elles de forma individual, i que es desviarà de l'efecte additiu dels dos al·lells. Actualment, existeixen diferents mètodes estadístics que permeten avaluar la presència d'interaccions gen*gen. En els estudis d'associació dels grups miR-183-96-182 i miR-34b/c, s'ha analitzat la presència d'interaccions epistàtiques entre les variants ubicades a la seqüència dels microARNs, i les variants de les regions 3' UTR de les seves dianes, aplicant models de regressió logística, un dels mètodes estadístics més utilitzats per avaluar l'epistasi entre variables discretes. Malauradament, en cap dels dos estudis es van poder identificar interaccions epistàtiques significatives.

Per altra banda, la complexitat etiològica del TDAH també inclou la presència d'**interaccions gen*ambient**, on els factors genètics associats al trastorn podrien aportar un risc addicional a través de la seva interrelació amb els factors ambientals, i de **correlacions gen-ambient**, on els factors genètics

podrien modificar la probabilitat de l'individu a exposar-se a un context ambiental concret (State and Thapar, 2015; Harold *et al.*, 2013). En els estudis aquí presentats no s'han pogut avaluar els possibles efectes de les interaccions i correlacions gen-ambient sobre la susceptibilitat a desenvolupar TDAH i, per tant, la pròpia complexitat de la base genètica subjacent al TDAH, i la presència d'interaccions gen*gen o gen*ambient, poden haver emmascarat i dificultat en algunes ocasions la detecció d'associacions significatives en els estudis aquí presentats.

2.5. Consideracions sobre els estudis d'expressió

En aquest treball de Tesi Doctoral s'han avaluat i comparat els nivells d'expressió de diferents gens i microARNs en PBMCs de subjectes adults amb TDAH i controls sans, mitjançant **microarrays** (en les anàlisis d'expressió i eQTLs a nivell transcriptòmic) i **RTqPCR**. (en l'avaluació de gens específics o la validació dels resultats dels *microarrays*).

En l'aplicació de qualsevol d'aquestes dues metodologies, un dels aspectes més importants a considerar és el control de la **variabilitat de les mostres**, ja que l'expressió gènica és molt susceptible a la influència de factors externs, el que podria condicionar la fiabilitat i replicabilitat dels resultats obtinguts (Stekel D, 2003). Per exemple, per tal d'evitar biaixos, és important assegurar que el tractament metodològic al que són sotmeses totes les mostres -des de la seva extracció, fins a l'anàlisi de les dades- és el mateix. En cas d'existir diferències, cal que aquestes siguin **bloquejades** o compensades mitjançant la inclusió de mostres de cadascun dels fenotips estudiats, processades amb cadascunes de les metodologies emprades, i que aquesta informació sigui inclosa en l'anàlisi estadístic posterior. En cas contrari, les diferències que s'identifiquin en la comparació dels fenotips estudiats no és podran destriar de les diferències degudes als procediments tècnics aplicats, el que s'anomena **efecte confusor**. Per tal de reduir al màxim la variabilitat entre experiments, també es recomana que en cada assaig s'avaluïn grups de mostres equilibrats en termes de fenotip o condició experimental, sexe, etc, i que tots els assajos siguin semblants entre ells, així com també es recomana la inclusió de diverses rèpliques per a cadascuna de les variables avaluades. Per altra banda, l'aplicació d'un bon abordatge bioinformàtic de les dades i la validació dels resultats obtinguts en els *microarrays* mitjançant un mètode independent, com la RTqPCR, també és crucial per a extreure conclusions fiables.

En els estudis realitzats aquí, s'han aplicat diferents estratègies per tal de minimitzar la variabilitat en els assajos d'expressió. Per una banda, l'extracció de les mostres tant dels casos com

dels controls, s'ha realitzat seguint exactament el mateix procediment, així com l'aïllament de l'ARNm i el seu emmagatzemament fins al moment de realitzar els assajos. La qualitat de l'ARNm de totes les mostres s'ha mesurat amb el sistema *Bioanalyzer*, i s'han inclòs aquelles que presentaven valors d'integritat d'ARN (RIN) de 8 a 10 (on 10 és el valor màxim). Tant en els assajos amb *microarrays*, com amb RTqPCR, les mostres s'han distribuït de forma equivalent en cadascuna de les plaques pel que fa a fenotip i a sexe, i addicionalment, aquelles variables que presentaven un potencial efecte confusor, com ara la placa (efecte de lot) o l'edat, han estat incloses com a covariables en els models estadístics posteriors si han mostrat evidències suggestives d'associació amb el fenotip d'estudi ($P < 0.2$) (Maldonado i Greenland, 1993). Per últim, els resultats obtinguts amb *microarrays* han estat validats amb RTqPCR.

Per altra banda, també es molt important tenir en compte el **teixit** en el que s'avaluen els perfils d'expressió gènica, ja que en termes generals, tant els nivells com els patrons d'expressió varien en funció del teixit. Per a molts trastorns complexos, l'accés tant als teixits patològics com als sans és relativament viable, mentre que per a trastorns neuropsiquiàtrics com el TDAH, l'obtenció de mostres de les regions cerebrals rellevants resulta pràcticament impossible, sobretot a l'hora de reclutar una mostra prou gran i representativa. En l'àmbit de l'esquizofrènia, per exemple, s'ha optat per l'obtenció de mostres *post-mortem* de necròpsies cerebrals, tot i que existeixen certes controvèrsies pel que fa l'efecte confusor sobre l'expressió gènica de factors com l'interval post-mortem o la forma de decés, el que pot haver contribuït a falta de consistència en els resultats reportats (McCullumsmith *et al.*, 2016). Tanmateix, en el cas del TDAH, aquesta opció no resulta viable i s'ha optat per cercar un teixit més accessible que constitueixi un substitut útil de l'expressió gènica a nivell del SNC. En els estudis realitzats en el marc d'aquest treball de Tesi Doctoral, les anàlisis d'expressió gènica s'han realitzat en PBMCs aïllats de mostres de sang perifèrica de subjectes amb TDAH i de controls sans. Existeixen evidències que indiquen que a nivell transcriptòmic, entre un 35% i un 80% dels transcrits coneguts estarien presents tant en mostres de sang com de cervell, i s'estima que la correlació de l'expressió gènica entre aquests dos teixits comprendria del 0,25 al 0,64, amb correlacions més fortes en conjunts concrets de gens, com ara els implicats en la modificació post-transcripcional de l'ARNm o en el tràfic de proteïnes (Tylee *et al.*, 2013). En aquest sentit, s'ha descrit que els processos biològics associats als perfils d'expressió no diferirien gaire entre sang i còrtex prefrontal, i que els mecanismes de transducció de senyals i l'expressió de receptors entre les cèl·lules d'ambdós teixits serien semblants (Tylee *et al.*, 2013; Sullivan *et al.*, 2006). Així mateix, també s'han identificat alteracions funcionals i metabòliques en les cèl·lules de la sang, concomitants a alteracions del funcionament i el metabolisme cel·lular a nivell

cerebral, amb desregulacions en els principals sistemes neurohormonals i de neurotransmissió. Això suggereix que a nivell perifèric es podria estar reflectint, fins a cert punt, la situació transcriptòmica existent al SNC. En esquizofrènia, s'han validat en teixit cerebral certes alteracions de l'expressió gènica identificades a en sang perifèrica o PBMCs, el que suggereix que, a més de ser potencials biomarcadors, aquests gens que presenten una expressió perifèrica desregulada podrien ser indicatius dels processos biològics alterats en el trastorn (Tylee *et al.*, 2013; Sullivan *et al.*, 2006). Pel que fa als microARNs, s'ha reportat que els patrons d'expressió al cervell serien similars als observats en PBMCs en un major proporció que a la resta de teixits, però que diferirien en relació a la seva abundància (Liang *et al.*, 2007). Per últim, altres estudis demostren també que aquest solapament es faria extensible als mecanismes de control de l'expressió, on una part significativa dels gens que presenten reguladors locals de tipus *cis*-eQTL a nivell cerebral, també presentaria aquesta regulació en sang perifèrica, i on existiria un solapament substancial entre les variants eQTL d'aquests dos teixits (Kim *et al.*, 2014). Per tant, tot i que els estudis aquí presentats s'han basat en l'anàlisi dels perfils d'expressió en PBMCs, les evidències reportades sobre l'expressió diferencial del miR-34c i del gen *RNF122* en TDAH assenten les bases per a futurs estudis que aprofundeixin en el paper d'aquests gens en el trastorn, i que explorin, no només la seva utilitat com a biomarcadors perifèrics de la classificació i el diagnòstic del trastorn, el seu pronòstic i la predicció de la resposta al tractament, sinó també el seu rol com a indicadors de potencials mecanismes etiològics del SNC subjacents al trastorn i de noves aproximacions terapèutiques. Aquest abordatge passa per l'exploració dels perfils d'expressió a nivell de SNC d'aquests, i d'altres gens i microARNs candidats en el TDAH.

3. Perspectives de Futur

Durant els darrers 20 anys s'han realitzat progressos significatius en la comprensió de l'etiologia dels trastorns complexos com el TDAH, sobretot pel que fa a l'arquitectura de la seva base genètica, i a la consolidació del paper de l'entorn i els mecanismes reguladors epigenètics en el seu desenvolupament i evolució. Els avenços en les tecnologies d'alt rendiment -com la genotipació massiva i els *microarrays*-, la disponibilitat d'informació genètica en panells de referència, l'establiment de col·laboracions internacionals, i la implementació de noves estratègies d'anàlisi estadística o la millora de les disponibles, han estat els pilars bàsics en els que s'han fonamentat aquests progressos.

Tanmateix, tot i que s'han identificat diversos factors de risc genètics implicats en el TDAH, així com alteracions en l'expressió de diversos gens i microARNs, resta per clarificar les causes exactes del trastorn, així com identificar els mecanismes moleculars subjacents a la seva fisiopatologia. Tot i la realització de múltiples estudis i l'aplicació de metodologies diverses, els resultats reportats mostren certes inconsistències i part dels factors de risc identificats no semblen ser conclouents. No obstant, la recerca que s'està duent a terme en l'actualitat, així com els projectes d'investigació planificats per als propers anys, amb gran probabilitat aportaran dades robustes sobre les bases etiològiques del TDAH. Es preveu que la tendència general dels estudis actuals segueixi apostant per la **tecnologia d'alt rendiment** en l'abordatge dels dominis òmics del TDAH, incloent l'anàlisi massiu de variants genètiques al llarg de tot el genoma, l'estudi de l'expressió gènica a nivell transcriptòmic, l'avaluació dels perfils d'expressió de microARNs i l'anàlisi dels patrons de metilació a gran escala.

En l'abordatge genètic del TDAH, les evidències disponibles fins al moment apunten a què l'elevada heretabilitat estimada del trastorn no s'explicaria exclusivament per l'efecte de variants comunes, sinó que també implicaria la contribució de variants de **baixa freqüència** i de **major penetrància**. Aquestes dades han promogut una ampliació del paradigma de recerca basat en la hipòtesi "*malaltia comuna - variant comuna*", per incloure la premissa "*malaltia comuna - variant rara*", aproximació que ha aportat -i segueix aportant- evidències significatives del paper en el trastorn de variants de baixa freqüència i major penetrància, com **SNPs disruptius** o potencialment **funcionals**, o variants estructurals com els **CNVs** (Demontis *et al.*, 2016; Zayats *et al.*, 2016; Hawi *et al.*, 2017). Addicionalment, els nous dissenys experimentals aposten per la realització de **GWAS** més potents, així

com per l'avaluació de totes les regions codificants del genoma (~1% genoma) mitjançant l'anàlisi d'**exomes**, sota el supòsit que la major part de les variants genètiques implicades en la fisiopatologia del trastorn estarien ubicades en regions exòniques i comprometrien la seqüència aminoacídica de la proteïna resultant. Actualment, diversos equips investigadors, així com consorcis i projectes internacionals com l'IMpACT i la Xarxa de Genètica Molecular del TDAH del PGC –dels que en forma part l'equip investigador-, o l'IMAGE (*International Multi-centre ADHD Genetics Project*), estan aplicant aquestes estratègies en la cerca de noves variants implicades en el trastorn. Mitjançant l'anàlisi d'exomes, s'han identificat tant polimorfismes comuns, com variants funcionals i disruptives, ubicades en gens nous o en gens candidats de risc, implicades en el TDAH (Demontis *et al.*, 2016; Zayats *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2017).

Per altra banda, es preveu que es mantingui la tendència dels darrers anys centrada en l'estudi de la influència de l'entorn i de l'impacte de les alteracions **epigenètiques** en l'aparició i progressió del TDAH, així com en el desenvolupament de cadascuna de les seves presentacions i comorbiditats (Bhat *et al.*, 2017; Archer *et al.*, 2011). Fins al moment, aquest enfocament ha permès confirmar el rol dels mecanismes epigenètics com a mediadors de l'acció de l'ambient en el TDAH, amb resultats prometedors sobretot pel que fa a l'alteració dels patrons d'**acetilació** d'histones i de **metilació** de l'ADN, així com en la regulació post-transcripcional exercida per ARNs no codificants, com els **microARNs**. En aquest sentit, i amb l'objectiu d'explorar el vincle entre genètica i epigenètica, existeix un creixent interès per l'abordatge de la variació genètica en elements reguladors de l'expressió, sobretot tenint present que s'estima que aquestes variants explicarien la major part de la variància fenotípica observada, i que es calcula que al voltant del 90% de les variants genètiques associades al TDAH no serien codificants, sinó que estarien ubicades en regions intergèniques o intròniques, aparentment sense una importància funcional definida (Hawi *et al.*, 2015). En aquesta àrea també s'estan obtenint bons resultats (Tong *et al.*, 2016), tal i com s'ha mostrat amb les evidències aportades en els estudis aquí presentats. Addicionalment, en diversos estudis es comencen a tenir en compte les **correlacions** i les **interaccions epistàtiques** entre gens, i entre aquests i l'ambient, ja que s'ha proposat que els seus efectes podrien explicar part de l'heretabilitat no explicada pels factors de risc genètics identificats fins al moment (Mackay TF, 2014). Tot i que la majoria d'estudis encara no els inclouen en els seus models, alguns estudis han reportat importants interaccions amb efectes significatius en el TDAH (Brinksma *et al.*, 2017; Bhat *et al.*, 2017; Segurado *et al.*, 2011). Finalment, un dels grans objectius que marcarà la recerca actual i en un futur és aportar dades sobre el complex mapa d'interrelacions que s'estableix entre la susceptibilitat genètica, la influència dels factors ambientals i

l'alteració dels mecanismes epigenètics, i de com aquesta xarxa impacta en l'expressió gènica, i en els nivells o la funció de les proteïnes cel·lulars, per a conduir, en darrera instància, a l'aparició d'un determinat fenotip. Per a respondre a aquest objectiu, s'estan duent a terme estudis basats en l'aplicació d'estratègies d'**integració** de dades i mètodes estadístics més potents per tal d'establir vincles entre tots aquests factors i el TDAH.

Una de les qüestions que ha dificultat l'obtenció de resultats significatius i consistents en l'àmbit del TDAH ha estat la **limitada mida mostral** considerada, sobretot en comparació amb els estudis realitzats en altres trastorns psiquiàtrics complexos, on s'ha disposat de mostres més grans i en els que sí que s'han reportat associacions robustes (Ripke *et al.*, 2013). No obstant, aquesta qüestió s'ha abordat a través de la creació de consorcis internacionals com la Xarxa de Genètica Molecular del TDAH, en el marc del PGC, i la seva col·laboració amb el projecte danès iPSYCH (*Lundbeck Foundation Initiative for Integrative Psychiatric Research*), que disposa de dades de més de 80.000 individus i que té com a objectiu estudiar els cinc majors trastorns psiquiàtrics des de l'etapa fetal fins l'adult. Gràcies a aquestes col·laboracions, s'ha pogut disposar de mostres molt més grans que estan fent possible la realització d'importants estudis en l'àrea del TDAH, més potents i informatius que els anteriors. Actualment, amb la participació del projecte iPSYCH, el PGC està duent a terme l'estudi de **metanàlisi** basat en dades de GWAS en TDAH més gran que s'ha realitzat fins al moment, amb un total de 20.183 subjectes amb el trastorn i 35.191 controls sans reclutats en 12 nodes diferents -entre els que s'inclou el nostre equip investigador. Aquest ambiciós projecte ha permès identificar, per primer cop, diferents *loci* associats a TDAH que superen els nivells de significació a escala genòmica (P -valor $<5e-05$), i que aportaran, inequívocament, evidències sobre la implicació de diversos gens en l'etiologia del TDAH (dades no publicades). Addicionalment, gràcies a aquestes iniciatives, s'han posat a l'abast de la comunitat científica dades sobre altres trastorns psiquiàtrics, el que ha permès explorar el solapament existent entre les seves bases etiològiques i el TDAH, àrea que també està reportant resultats interessants (Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2013a i 2013b).

Per altra banda, treballar sota el paradigma actual que considera el TDAH com una entitat unitària, podria contraposar-se al guany de poder estadístic que s'espera aconseguir a través de l'augment de la mida mostral, en tant que els sistemes nosològics disponibles actualment, vàlids per al diagnòstic clínic, poden no estar reflectint la base biològica del trastorn o poden no ser prou específics per a detectar gens implicats. Per aquesta raó, alguns investigadors proposen un canvi de perspectiva vers l'aplicació d'aproximacions dimensionals del TDAH. Tot i que s'han identificat dominis a diferents nivells, encara no

s'ha establert de forma fixa el tipus de dimensions que millor representen el trastorn ni com s'haurien de mesurar -per exemple, considerant **mesures quantitatives** dels símptomes o de tests cognitius, **endofenotips** amb base empírica com ara marcadors de **neuroimatge** funcional i estructural, o fins i tot, en l'àrea de la farmacogenètica, com la **resposta al tractament** -. Es proposa que la distinció de cadascuna de les presentacions del TDAH com a endofenotips cerebrals, i la conseqüent reducció de l'heterogeneïtat clínica, podria afavorir la identificació de nous gens implicats en el trastorn, així com dels mecanismes neurofisiològics específics subjacents a cada endofenotip. Això permetria elucidar aspectes quantitius i mecànics de la funció cerebral en el TDAH i caracteritzar els vincles que s'estableixen entre la funció gènica i la resposta conductual. Tanmateix, l'èxit de les estratègies basades en endofenotips requereix que aquests presentin una major heretabilitat que el trastorn *per se*, o bé una arquitectura genètica menys complexa amb un número menor de gens implicats. No obstant, aquests endofenotips podrien resultar poc específics pel trastorn, de manera que no tots els gens que explicarien la varianza d'un endofenotip concret acabarien incrementant el risc a desenvolupar TDAH. Concretament, aquest abordatge s'ha implementat amb èxit en el projecte col·laboratiu IMAGE, una àrea de recerca que s'ha centrat en l'estudi sistemàtic del genoma amb l'objectiu d'identificar nous gens o sistemes de gens implicats en el TDAH a través de la combinació d'estratègies basades en trets categòrics i quantitius, com ara endofenotips cognitius del trastorn. Fins al moment, aquest projecte ha reportat evidències suggestives d'associació entre 18 gens i la presentació combinada del TDAH (Kuntsi *et al.*, 2006; Brookes *et al.*, 2006).

Per altra banda, amb l'objectiu de contribuir a la comprensió de l'estructura i la funció cerebrals, i la traducció de la seva alteració en els trastorns neuropsiquiàtrics a través de la genètica i la neuroimatge, es va consolidar el consorci internacional de ENIGMA (*Enhancing Neuro Imaging Genetics through Meta-Analysis*). Amb l'objectiu de proporcionar dades que en un futur puguin contribuir a la distinció d'endofenotips cerebrals del trastorn, el grup de treball de TDAH d'aquest consorci ha dut a terme l'estudi més gran de neuroimatge estructural realitzat en aquest trastorn, considerant més de 3.200 subjectes (Hoogman *et al.*, 2017). Els resultats obtinguts han aportat evidències significatives sobre l'alteració en el TDAH del volum cerebral total, així com de regions subcorticals, i recolzen la teoria del retard maduratiu del cervell en TDAH, ampliant l'afectació també a estructures subcorticals. A més, descarten els efectes de la medicació sobre el volum cerebral que s'havien suggerit en base a estudis previs de metanàlisi (Kasperek *et al.*, 2015).

En línia amb aquest plantejament, la tendència en l'abordatge del TDAH serà seguir considerant de forma independent la **població infantil** i la **població adulta** per tal de minimitzar l'heterogeneïtat de les mostres, ja que existeixen evidències que indiquen que tindrien una base genètica diferenciada (Franke *et al.*, 2012). Durant els darrers anys, s'han anat acumulant dades que recolzen que el TDAH és una condició crònica que pot persistir a l'edat adulta i, finalment, en l'edició vigent del DSM (DSM-V), s'han proporcionat eines oficials pel diagnòstic específic del trastorn en l'adolescent i l'adult. Seran necessaris estudis addicionals que determinin el funcionament operant d'aquest sistema en la pràctica clínica i l'efecte dels nous criteris en les estimacions de la prevalença del trastorn en l'adult. Per a estudis futurs, es proposa dissenyar nous algorismes de diagnòstic que integrin de forma balancejada els llindars de símptomes i el deteriorament funcional, i que permetin diferenciar grups d'edat més restringits -com ara preescolar, infantil, adolescent i adult-. Addicionalment, estudis recents han explorat les formes de **desenvolupament tardà del TDAH** -per sobre dels 12 anys que marquen els criteris del DSM-V-, i proposen que aquesta presentació correspondria a una síndrome diferenciada del TDAH amb inici a la infantesa (Agnew-Blais *et al.*, 2016). Tanmateix, aquest concepte ha suscitat certa controvèrsia, i s'ha proposat que l'absència de diagnòstic a l'etapa infantil en aquests individus podria ser conseqüència de diversos factors, com el biaix en l'auto-percepció de la simptomatologia, dèficits funcionals a la infantesa durant l'avaluació retrospectiva o d'un diagnòstic erroni a l'adult, o incomplet o confús a l'edat infantil. Per altra banda, també podria deure's a l'existència d'una presentació de TDAH infantil sub-llindar, en el que l'aparició de símptomes i el deteriorament funcional podrien estar separats per molts anys, sobretot en aquells individus amb un coeficient intel·lectual elevat o que han crescut en un ambient social reforçat, ben estructurat i amb recolzament (Faraone i Biederman, 2016). Per aquesta raó, són necessaris estudis addicionals que explorin si el TDAH pot tenir realment un desenvolupament tardà, i si aquest constitueix una entitat independent de la forma que s'origina a la infantesa o, si pel contrari, es tracta d'una qüestió intrínseca a la complexitat i multifactorialitat d'un TDAH que s'entén com l'extrem d'un tret dimensional. Segons aquest darrer concepte, la simptomatologia i els dèficits funcionals del trastorn sorgirien quan l'acumulació de factors de risc excedís un llindar, de manera que els individus amb menor risc al néixer, trigarien més a acumular suficients factors de risc per a desenvolupar la simptomatologia i la discapacitat associades al trastorn. La caracterització de la presentació tardana del TDAH tindrà repercussions tant a nivell de pràctica clínica, com a nivell de recerca, on caldrà determinar si l'edat d'inici s'ha d'incloure com a criteri diagnòstic i de quina manera. L'abordatge a través d'**estudis longitudinals** permetrà entendre l'evolució d'aquest trastorn, així com identificar predictors neurals de la forma remissiva o persistent.

Per altra banda, una altra font d'heterogeneïtat inherent al TDAH és la seva elevada **comorbiditat** amb múltiples trastorns psiquiàtrics i somàtics. Com s'ha mostrat en els estudis aquí presentats, tenir en compte els perfils de comorbiditat dels subjectes amb TDAH i considerar presentacions més homogènies pot afavorir la identificació de factors de risc pel trastorn i la distinció d'aquells que són específics de cada presentació. Cada cop són més els estudis que tenen en compte les comorbiditats que acompanyen el TDAH i que n'aborden la seva anàlisi, plantejament que s'ha materialitzat en col·laboracions internacionals com el projecte CoCA (*Comorbid Conditions of ADHD*; <http://coca-project.eu/>) -del que en forma part l'equip investigador-. Durant els 5 anys de duració d'aquest projecte, s'abordarà de forma multidisciplinària l'estudi del TDAH i algunes de les seves comorbiditats més freqüents -els trastorns de l'ànim i l'ansietat, els SUD i l'obesitat-. La recerca realitzada en el marc d'aquest projecte ja ha començat a reportar resultats significatius pel que fa la comorbiditat entre TDAH, els trets d'agressivitat i les alteracions del ritme circadià, així com en relació a l'elevada correlació genètica que presenta amb el trastorn bipolar (van Hulzen *et al.*, 2016; Mogavero *et al.*, 2016).

Finalment, les dades proporcionades pels estudis que s'estan duent a terme a l'actualitat permetran millorar el diagnòstic conductual del TDAH i establiran en un futur les bases per a un **diagnòstic precoç i objectiu** basat en **biomarcadors**. La identificació de factors de risc genètics i ambientals que puguin actuar com a biomarcadors del trastorn i dels seus endofenotips, distingint entre aquells que condueixen al desenvolupament del TDAH, els que condicionen la seva progressió longitudinal i una major severitat clínica, permetrà millorar la fiabilitat del **pronòstic** i de la predicció de la **resposta als tractaments**. Al seu torn, aquesta informació conduirà a l'elecció de les **dinàmiques de prevenció** més adequades i al disseny d'**abordatges farmacològics personalitzats**, reconduint les teràpies actuals i promovent el desenvolupament de nous tractaments dirigits a substrats biològics concrets. Tot i que, actualment, cap dels biomarcadors proposats compleix els criteris de validesa, es proposa que l'aplicació futura d'algoritmes d'aprenentatge de màquines (*Machine Learning*) podria revelar patrons multivariants de dades basades en biomarcadors de diferents dominis amb una major fiabilitat predictiva.

En conclusió, gràcies a les innovacions en la recerca del TDAH, juntament amb l'establiment d'importants col·laboracions internacionals i interdisciplinàries, es preveu un futur prometedor en la investigació d'aquest trastorn, en el que es realitzaran importants avenços en el coneixement de la seva etiologia, es millorarà el diagnòstic i la capacitat de pronòstic, i s'optimitzaran les estratègies de

prevenció i els abordatges terapèutics, amb l'objectiu final de proporcionar una millor qualitat de vida als individus que pateixen TDAH, així com les seves famílies.

CONCLUSIONS

En aquest treball de Tesi Doctoral s'ha avaluat la participació de variants polimòrfiques de nucleòtid únic (SNP) en la susceptibilitat al Trastorn per Dèficit d'Atenció amb Hiperactivitat (TDAH) a través d'estudis d'associació poblacionals de tipus cas-control, tant per mitjà de l'anàlisi de regions candidates com de l'abordatge massiu de variants genètiques al llarg de tot el genoma (GWAS). Aquestes aproximacions s'han complementat amb anàlisis d'associació a escala genòmica basats en gens, estudis de rèplica i metanàlisi, i anàlisis d'enriquiment de funcions biològiques específiques i vies de senyalització cel·lulars. Addicionalment, s'han estudiat els perfils d'expressió dels gens associats a TDAH en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs) en subjectes amb el trastorn.

A continuació s'exposen les conclusions que es poden derivar a partir dels resultats obtinguts en el marc d'aquesta Tesi Doctoral.

1. L'estudi del paper del grup miR-183-96-182 i la seva diana gènica *HTR1B* en el TDAH persistent mitjançant un estudi d'associació cas-control poblacional ha permès identificar l'associació entre dues variants genètiques ubicades al *locus* que conté aquests microARNs i el TDAH persistent sense Trastorns per Ús de Substàncies (TUS), i el TDAH sense TUS ni trastorns de la conducta comòrbids.
2. La identificació de factors de risc genètics associats al TDAH sense TUS, i al TDAH sense TUS ni trastorns de la conducta, suggereix l'existència d'una base genètica diferencial implicada en el TDAH amb o sense trastorns comòrbids.
3. L'avaluació de l'impacte en el TDAH de la variació genètica comuna en elements reguladors, considerant 134 microARNs, ha aportat evidències suggestives sobre la contribució del grup miR-34b/c i algunes de les seves dianes gèniques a la susceptibilitat a desenvolupar el trastorn, possiblement a través de la desregulació de la seva expressió i la de les seves dianes, i l'alteració de processos biològics implicats en el desenvolupament neuronal i l'axonogènesi, i la biosíntesi i el metabolisme lipídic.
4. L'avaluació massiva de variants genètiques mitjançant un estudi GWAS basat en SNPs en TDAH persistent, recolza el paper del gen *FBXO33* en el TDAH, possiblement a través de mecanismes que impliquen l'alteració de la seva expressió i el seu possible efecte en el volum del gir post-

central esquerra, resultats que reforcen la participació de la via ubiquitina-proteosoma en l'etiologia del trastorn.

5. L'avaluació massiva de variants genètiques mitjançant un estudi GWAS basat en gens en TDAH persistent i estudis d'expressió gènica en PBMCs, ha permès identificar el gen *RNF122* com a candidat prometedor a participar en la susceptibilitat a desenvolupar TDAH. Alhora, aquests resultats han aportat evidències addicionals sobre la implicació del gen *FBXO33* i la participació de la via ubiquitina-proteosoma i altres processos de tràfic vesicular intracel·lular en el trastorn.
6. Aquest treball de Tesi Doctoral ha fet palesa la necessitat d'augmentar el poder estadístic dels estudis que aborden la complexitat del TDAH, tant per mitjà de la reducció de l'heterogeneïtat fenotípica i, en conseqüència, l'heterogeneïtat genètica, considerant endofenotips més heretables i menys complexos del TDAH; com a través de l'augment de la mida mostral, gràcies a l'establiment d'importantes col·laboracions internacionals i multidisciplinars.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografia

1000 Genomes Project Consortium, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015 Oct 1; **526(7571)**: 68-74.

A

Abou-Sleiman PM, Hanna MG, Wood NW. Genetic association studies of complex neurological diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006 Dec; **77(12)**: 1302-4.

Abu-Elneel K, Liu T, Gazzaniga FS, Nishimura Y, Wall DP, Geschwind DH, et al. Heterogeneous dysregulation of microRNAs across the autism spectrum. *Neurogenetics*. 2008 Jul; **9(3)**: 153-61.

Achenbach T, Edelbrock C. Manual for the child behavior checklist and revised behavior profile. Burlington: University of Vermont, Department of Psychiatry; 1983.

Adkins DE, Clark SL, Copeland WE, Kennedy M, Conway K, Angold A, et al. Genome-Wide Meta-Analysis of Longitudinal Alcohol Consumption Across Youth and Early Adulthood. *Twin Res Hum Genet*. 2015 Aug; **18(4)**: 335-47.

Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife*. 2015 Aug 12; **4**.

Agnew-Blais JC, Polanczyk GV, Danese A, Wertz J, Moffitt TE, Arseneault L. Evaluation of the Persistence, Remission, and Emergence of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in Young Adulthood. *JAMA Psychiatry*. 2016 Jul 1; **73(7)**: 713-20.

Akbarian S, Nestler EJ. Epigenetic mechanisms in psychiatry. *Neuropsychopharmacology*. 2013 Jan; **38(1)**: 1-2.

Albayrak O, Friedel S, Schimmelmann BG, Hinney A, Hebebrand J. Genetic aspects in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Neural Transm (Vienna)*. 2008; **115(2)**: 305-15.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell. 4th ed. New York: Garland Science; 2002.

Albutt TC. Insanity in children. In: Tuke H. A dictionary of psychological medicine. London: JA Churchill; 1892.

Aleman S, Ribasés M, Vilor-Tejedor N, Bustamante M, Sánchez-Mora C, Bosch R, et al. New suggestive genetic loci and biological pathways for attention function in adult attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2015 Sep; **168(6)**: 459-470.

Ament SA, Szelinger S, Glusman G, Ashworth J, Hou L, Akula N, et al. Rare variants in neuronal excitability genes influence risk for bipolar disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Mar 17; **112(11)**: 3576-81.

American Academy of Pediatrics. Subcommittee on Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Committee on Quality Improvement. Treatment of the school-aged child with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pediatrics*. 2001; **108**: 1033-1044.

- American Academy of Pediatrics/American Heart Association. American Academy of Pediatrics/American Heart Association clarification of statement on cardiovascular evaluation and monitoring of children and adolescents with heart disease receiving medications for ADHD: May 16, 2008. *J Dev Behav Pediatr*. 2008 Aug; **29(4)**: 335.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-II). 2nd ed. Washington DC: American Psychiatric Association; 1968.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-III). 3rd ed. Washington DC: American Psychiatric Association; 1980.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-III-R). 3rd ed rev. Washington DC: American Psychiatric Association; 1987.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-IV). 4th ed. Washington DC: American Psychiatric Association; 1994.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-IV). 4th ed, text revision. Washington DC: American Psychiatric Association; 2000.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-V). 5th ed. Washington DC: American Psychiatric Association; 2013.
- Andrus BM, Blizinsky K, Vedell PT, Dennis K, Shukla PK, Schaffer DJ, *et al*. Gene expression patterns in the hippocampus and amygdala of endogenous depression and chronic stress models. *Mol Psychiatry*. 2012 Jan; **17(1)**: 49-61.
- Anney R, Klei L, Pinto D, Regan R, Conroy J, Magalhaes TR, *et al*. A genome-wide scan for common alleles affecting risk for autism. *Hum Mol Genet*. 2010; **19**: 4072-82.
- Antalis CJ, Stevens LJ, Campbell M, Pazdro R, Ericson K, Burgess JR. Omega-3 fatty acid status in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2006 Oct-Nov; **75(4-5)**: 299-308.
- Antshel KM, Olszewski AK. Cognitive behavioral therapy for adolescents with ADHD. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*. 2014 Oct; **23(4)**: 825-42.
- Antshel KM, Zhang-James Y, Wagner KE, Ledesma A, Faraone SV. An update on the comorbidity of ADHD and ASD: a focus on clinical management. *Expert Rev Neurother*. 2016; **16(3)**: 279-93.
- Archer T, Oscar-Berman M, Blum K. Epigenetics in Developmental Disorder: ADHD and Endophenotypes. *J Genet Syndr Gene Ther*. 2011 Jun 30; **2(104)**. pii: 1000104.
- Arcos-Burgos M, Castellanos FX, Pineda D, Lopera F, Palacio JD, Palacio LG, *et al*. Attention-deficit/hyperactivity disorder in a population isolate: linkage to loci at 4q13.2, 5q33.3, 11q22, and 17p11. *Am J Hum Genet*. 2004 Dec; **75(6)**: 998-1014.
- 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 Nov; **15(11)**: 1053-66.

- Arns M, de Ridder S, Strehl U, Breteler M, Coenen A. Efficacy of neurofeedback treatment in ADHD: the effects on inattention, impulsivity and hyperactivity: a meta-analysis. *Clin EEG Neurosci*. 2009 Jul; **40(3)**: 180-9.
- Asherson P, Akehurst R, Kooij JJ, Huss M, Beusterien K, Sasané R, et al. Under diagnosis of adult ADHD: cultural influences and societal burden. *J Atten Disord*. 2012 Jul; **16(5 Suppl)**: 20S-38S.
- Asherson P, Bushe C, Saylor K, Tanaka Y, Deberdt W, Upadhyaya H. Efficacy of atomoxetine in adults with attention deficit hyperactivity disorder: an integrated analysis of the complete database of multicenter placebo-controlled trials. *J Psychopharmacol*. 2014 Sep; **28(9)**: 837-46.
- Asherson P, Gurling H. Quantitative and molecular genetics of ADHD. *Curr Top Behav Neurosci*. 2012; **9**: 239-72.
- Asherson P, Zhou K, Anney RJ, Franke B, Buitelaar J, Ebstein R, et al. A high-density SNP linkage scan with 142 combined subtype ADHD sib pairs identifies linkage regions on chromosomes 9 and 16. *Mol Psychiatry*. 2008 May; **13(5)**: 514-21.
- Ashtari M, Kumra S, Bhaskar SL, Clarke T, Thaden E, Cervellione KL, et al. Attention-deficit/hyperactivity disorder: a preliminary diffusion tensor imaging study. *Biol Psychiatry*. 2005 Mar 1; **57(5)**: 448-55.
- Atkinson M, Hollis C. NICE guideline: attention deficit hyperactivity disorder. *Arch Dis Child Educ Pract Ed*. 2010 Feb; **95(1)**: 24-7.

B

- Balding DJ. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet*. 2006 Oct; **7(10)**: 781-91.
- Banaschewski T, Becker K, Scherag S, Franke B, Coghill D. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: an overview. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2010 Mar; **19(3)**: 237-57.
- Banaschewski T, Coghill D, Santosh P, Zuddas A, Asherson P, Buitelaar J, et al. Long-acting medications for the hyperkinetic disorders. A systematic review and European treatment guideline. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2006 Dec; **15(8)**: 476-95.
- Barkley RA, Fischer M, Smallish L, Fletcher K. Young adult follow-up of hyperactive children: antisocial activities and drug use. *J Child Psychol Psychiatry*. 2004 Feb; **45(2)**: 195-211.
- Barkley RA, Peters H. 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*. 2012; **16**: 623-630.
- Batty MJ, Liddle EB, Pitiot A, Toro R, Groom MJ, Scerif G, et al. Cortical gray matter in attention-deficit/hyperactivity disorder: a structural magnetic resonance imaging study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2010 Mar; **49(3)**: 229-38.
- Belzeaux R, Bergon A, Jeanjean V, Loriod B, Formisano-Tréziny C, Verrier L, Loundou A, Baumstarck-Barrau K, Boyer L, Gall V, Gabert J, Nguyen C, Azorin JM, Naudin J, Ibrahim EC. Responder and nonresponder

- patients exhibit different peripheral transcriptional signatures during major depressive episode. *Transl Psychiatry*. 2012 Nov 13; **2**: e185.
- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol*. 1995; **57(1)**: 289–300.
- Berenguer-Forner C, Miranda-Casas A, Pastor-Cerezuela G, Roselló-Miranda R. Comorbidity of autism spectrum disorder and attention deficit with hyperactivity. A review study. *Rev Neurol*. 2015 Feb 25; **60 Suppl 1**: S37-43.
- Bergen SE, O'Dushlaine CT, Ripke S, Lee PH, Ruderfer DM, Akterin S, *et al*. Genome-wide association study in a Swedish population yields support for greater CNV and MHC involvement in schizophrenia compared with bipolar disorder. *Mol Psychiatry*. 2012 Sep; **17(9)**: 880-6.
- Berko ER, Suzuki M, Beren F, Lemetre C, Alaimo CM, *et al*. Calder RB1 Mosaic epigenetic dysregulation of ectodermal cells in autism spectrum disorder. *PLoS Genet*. 2014 May 29; **10(5)**: e1004402.
- Berto S, Usui N, Konopka G, Fogel BL, *et al*. ELAVL2-regulated transcriptional and splicing networks in human neurons link neurodevelopment and autism. *Hum Mol Genet*. 2016 Jun 15; **25(12)**: 2451-2464.
- Beveridge NJ, Gardiner E, Carroll AP, Tooney PA, Cairns MJ. Schizophrenia is associated with an increase in cortical microRNA biogenesis. *Mol Psychiatry*. 2010 Dec; **15(12)**: 1176-89.
- Bhat V, Joober R, Sengupta SM. How Environmental Factors Can Get Under the Skin: Epigenetics in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2017 Apr; **56(4)**: 278-280.
- Bidwell LC, Willcutt EG, Defries JC, Pennington BF. Testing for neuropsychological endophenotypes in siblings discordant for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*. 2007 Nov 1; **62(9)**: 991-8.
- Biederman J, Spencer T. Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) as a noradrenergic disorder. *Biol Psychiatry*. 1999 Nov 1; **46(9)**: 1234-42.
- Biederman J, Faraone S, Milberger S, Curtis S, Chen L, Marris A, *et al*. Predictors of persistence and remission of ADHD into adolescence: results from a four-year prospective follow-up study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1996; **35**: 343–351.
- Biederman J, Faraone SV, Keenan K, Benjamin J, Krifcher B, Moore C, *et al*. Patterns of comorbidity in probands and relatives psychiatrically and pediatrically referred samples. *Arch Gen Psychiatry*. 1992 Sep; **49(9)**: 728-38.
- Biederman J, Faraone SV, Keenan K, Knee D, Tsuang MT. Family-genetic and psychosocial risk factors in DSM-III attention deficit disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1990 Jul; **29(4)**: 526-33.
- Biederman J, Faraone SV, Monuteaux MC, Bober M, Cadogen E. Gender effects on attention-deficit/hyperactivity disorder in adults, revisited. *Biol Psychiatry*. 2004 Apr 1; **55(7)**: 692-700.
- Biederman J, Faraone SV, Taylor A, Sienna M, Williamson S, Fine C. Diagnostic continuity between child and adolescent ADHD: findings from a longitudinal clinical sample. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1998 Mar; **37(3)**: 305-13.
- Biederman J, Faraone SV. Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet*. 2005 Jul 16-22; **366(9481)**: 237-48.

- Biederman J, Faraone SV. The effects of attention-deficit/hyperactivity disorder on employment and household income. *MedGenMed*. 2006 Jul 18; **8(3)**: 12.
- Biederman J, Melmed RD, Patel A, McBurnett K, Donahue J, Lyne A. Long-term, open-label extension study of guanfacine extended release in children and adolescents with ADHD. *CNS Spectr*. 2008a Dec; **13(12)**: 1047-55.
- Biederman J, Mick E, Faraone SV. Age-dependent decline of symptoms of attention deficit hyperactivity disorder: impact of remission definition and symptom type. *Am J Psychiatry*. 2000 May; **157(5)**: 816-8.
- Biederman J, Monuteaux MC, Mick E, Spencer T, Wilens TE, Silva JM, *et al*. Young adult outcome of attention deficit hyperactivity disorder: a controlled 10-year follow-up study. *Psychol Med*. 2006 Feb; **36(2)**: 167-79.
- Biederman J, Spencer T, Lomedico A, Day H, Petty CR, Faraone SV. Deficient emotional self-regulation and pediatric attention deficit hyperactivity disorder: a family risk analysis. *Psychol Med*. 2012 Mar; **42(3)**: 639-46.
- Bird H. The diagnostic classification, epidemiology and cross-cultural validity of ADHD. In: Jensen PS, Cooper JR. Attention deficit hyperactivity disorder: state of science: best practices. Kingston, New Jersey: Civic Research institute; 2002
- Bitsakou P, Psychogiou L, Thompson M, Sonuga-Barke EJ. Delay Aversion in Attention Deficit/Hyperactivity Disorder: an empirical investigation of the broader phenotype. *Neuropsychologia*. 2009 Jan; **47(2)**: 446-56.
- Bokor G, Anderson PD. Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *J Pharm Pract*. 2014 Aug; **27(4)**: 336-49.
- Bonifer C, Cockerill PN. Chromatin mechanisms regulating gene expression in health and disease. *Adv Exp Med Biol*. 2011; **711**: 12-25.
- Borland BL, Heckman HK. Hyperactive boys and their brothers. A 25-year follow-up study. *Arch Gen Psychiatry*. 1976 Jun; **33(6)**: 669-75.
- Boumeville E. Traitement médico-pédagogique des différentes formes de l'idiotie. Paris: Alcan; 1897.
- Bousman CA, Chana G, Glatt SJ, Chandler SD, Lucero GR, Tatro E, *et al*. Preliminary evidence of ubiquitin proteasome system dysregulation in schizophrenia and bipolar disorder: convergent pathway analysis findings from two independent samples. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2010a Mar 5; **153B(2)**: 494-502.
- Bousman CA, Chana G, Glatt SJ, Chandler SD, May T, Lohr J, Kremen WS, Positive symptoms of psychosis correlate with expression of ubiquitin proteasome genes in peripheral blood. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2010b Oct 5; **153B(7)**: 1336-41.
- Bradley C. The behavior of children receiving benzedrine. *Am J Psychiatry*. 1937; **94**: 577-585
- Braun NN, Reutiman TJ, Lee S, Folsom TD, Fatemi SH. Expression of phosphodiesterase 4 is altered in the brains of subjects with autism. *Neuroreport*. 2007 Nov 19; **18(17)**: 1841-4.

- Braun S, Zeidler J, Linder R, Engel S, Verheyen F, Greiner W. Treatment costs of attention deficit hyperactivity disorder in Germany. *Eur J Health Econ*. 2013 Dec; **14(6)**: 939-45.
- Brevik EJ, van Donkelaar MM, Weber H, Sánchez-Mora C, Jacob C, Rivero O, *et al*. Genome-wide analyses of aggressiveness in attention-deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2016 Jul; **171(5)**: 733-47.
- Brinksma DM, Hoekstra PJ, van den Hoofdakker B, de Bildt A, Buitelaar JK, Hartman CA, *et al*. Age-dependent role of pre- and perinatal factors in interaction with genes on ADHD symptoms across adolescence. *J Psychiatr Res*. 2017 Feb 21; **90**: 110-117.
- Brookes K, Xu X, Chen W, Zhou K, Neale B, Lowe N, *et al*. The analysis of 51 genes in DSM-IV combined type attention deficit hyperactivity disorder: association signals in DRD4, DAT1 and 16 other genes. *Mol Psychiatry*. 2006 Oct; **11(10)**: 934-53.
- Brotman MA, Rich BA, Guyer AE, Lunsford JR, Horsey SE, Reising MM *et al*. Amygdala activation during emotion processing of neutral faces in children with severe mood dysregulation versus ADHD or bipolar disorder. *Am J Psychiatry*. 2010 Jan; **167(1)**: 61-9.
- Bushé CJ, Savill NC. Systematic review of atomoxetine data in childhood and adolescent attention-deficit hyperactivity disorder 2009-2011: focus on clinical efficacy and safety. *J Psychopharmacol*. 2014 Mar; **28(3)**: 204-11.

C

- Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2009 Dec; **7(4)**: 147-54.
- Cammaerts S, Strazisar M, De Rijk P, Del Favero J. Genetic variants in microRNA genes: impact on microRNA expression, function, and disease. *Front Genet*. 2015 May 21; **6**: 186.
- Campbell DB, Sutcliffe JS, Ebert PJ, Militerni R, Bravaccio C, Trillo S, *et al*. A genetic variant that disrupts MET transcription is associated with autism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Nov 7; **103(45)**: 16834-9.
- Cantwell DP. Psychiatric illness in the families of hyperactive children. *Arch Gen Psychiatry*. 1972 Sep; **27(3)**: 414-7.
- Carpentier PJ, Arias Vasquez A, Hoogman M, Onnink M, Kan CC, Kooij JJ, *et al*. Shared and unique genetic contributions to attention deficit/hyperactivity disorder and substance use disorders: a pilot study of six candidate genes. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2013 Jun; **23(6)**: 448-57.
- Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res*. 2003 Jul 1; **31(13)**: 3568-71.
- Casey BJ, Epstein JN, Buhle J, Liston C, Davidson MC, Tonev ST, *et al*. Frontostriatal connectivity and its role in cognitive control in parent-child dyads with ADHD. *Am J Psychiatry*. 2007 Nov; **164(11)**: 1729-36.

- Castellanos FX, Lee PP, Sharp W, Jeffries NO, Greenstein DK, Clasen LS, et al. Developmental trajectories of brain volume abnormalities in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *JAMA*. 2002 Oct 9; 288(14): 1740-8.
- Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet*. 2009; 10(5): 295–304.
- Chandrasekar V, Dreyer JL. microRNAs miR-124, let-7d and miR-181a regulate cocaine-induced plasticity. *Mol Cell Neurosci*. 2009 Dec; **42(4)**: 350-62.
- Chang H, Hoshina N, Zhang C, Ma Y, Cao H, Wang Y, et al. The protocadherin 17 gene affects cognition, personality, amygdala structure and function, synapse development and risk of major mood disorders. *Mol Psychiatry*. 2017 Jan 10. [En premsa]
- Chang Z, Lichtenstein P, D'Onofrio BM, Sjölander A, Larsson H. Serious transport accidents in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder and the effect of medication: a population-based study. *JAMA Psychiatry*. 2014 Mar; 71(3): 319-25.
- Chen P, Huang K, Zhou G, Zeng Z, Wang T, Li B, et al. Common SNPs in CSF2RB are associated with major depression and schizophrenia in the Chinese Han population. *World J Biol Psychiatry*. 2011 Apr; **12(3)**: 233-8.
- Chen Q, Wang X, O'Neill FA, Walsh D, Fanous A, Kendler KS, et al. Association study of CSF2RB with schizophrenia in Irish family and case - control samples. *Mol Psychiatry*. 2008 Oct; **13(10)**: 930-8.
- Cheuk DK, Wong V. Meta-analysis of association between a catechol-O-methyltransferase gene polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder. *Behav Genet*. 2006 Sep; 36(5): 651-9.
- Childress AC, Sallee FR. Attention-deficit/hyperactivity disorder with inadequate response to stimulants: approaches to management. *CNS Drugs*. 2014 Feb; 28(2): 121-9.
- Chow ML, Pramparo T, Winn ME, Barnes CC, Li HR, Weiss L, Fan JB, et al. Age-dependent brain gene expression and copy number anomalies in autism suggest distinct pathological processes at young versus mature ages. *PLoS Genet*. 2012; **8(3)**: e1002592.
- Cipolla GA. A non-canonical landscape of the microRNA system. *Front Genet*. 2014 Sep 23; 5: 337.
- Clements SD. Minimal brain dysfunction in children: terminology and identification: phase one of a three-phase project. Washington DC: US Department of Health, Education and Welfare; 1966.
- Clemow DB, Bushe C, Mancini M, Ossipov MH, Upadhyaya H. A review of the efficacy of atomoxetine in the treatment of attention-deficit hyperactivity disorder in children and adult patients with common comorbidities. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2017 Feb 3; **13**: 357-371.
- Clouston TS. Stages of over-excitability, hypersensitiveness and mental explosiveness in children and their treatment by the bromides. *Scottish Med Surg J* 1899; **4**: 481-490.
- Codina-Solà M, Rodríguez-Santiago B, Homs A, Santoyo J, Rigau M, Aznar-Laín G, et al. Integrated analysis of whole-exome sequencing and transcriptome profiling in males with autism spectrum disorders. *Mol Autism*. 2015 Apr 15; **6**: 21.

- Codocedo JF, Inestrosa NC. Environmental control of microRNAs in the nervous system: Implications in plasticity and behavior. *Neurosci Biobehav Rev.* 2016 Jan; **60**: 121-38.
- Coghill DR, Seth S, Matthews K. A comprehensive assessment of memory, delay aversion, timing, inhibition, decision making and variability in attention deficit hyperactivity disorder: advancing beyond the three-pathway models. *Psychol Med.* 2014 Jul; **44(9)**: 1989-2001.
- Collishaw S. Annual research review: Secular trends in child and adolescent mental health. *J Child Psychol Psychiatry.* 2015 Mar; **56(3)**: 370-93.
- Coogan AN, McGowan NM. A systematic review of circadian function, chronotype and chronotherapy in attention deficit hyperactivity disorder. *Atten Defic Hyperact Disord.* 2017 Jan 7. [En premsa]
- Cook EH Jr, Stein MA, Krasowski MD, Cox NJ, Olkon DM, Kieffer JE, *et al.* Association of attention-deficit disorder and the dopamine transporter gene. *Am J Hum Genet.* 1995 Apr; **56(4)**: 993-8.
- Cookson W, Liang L, Abecasis G, Moffatt M, Lathrop M. Mapping complex disease traits with global gene expression. *Nat Rev Genet.* 2009 Mar; **10(3)**:184-94.
- Cortese S, Faraone SV, Bernardi S, Wang S, Blanco C. Adult attention-deficit hyperactivity disorder and obesity: epidemiological study. *Br J Psychiatry.* 2013 Jul; **203(1)**: 24-34.
- Cortese S, Ferrin M, Brandeis D, Buitelaar J, Daley D, Dittmann RW, *et al*; European ADHD Guidelines Group (EAGG). Cognitive training for attention-deficit/hyperactivity disorder: meta-analysis of clinical and neuropsychological outcomes from randomized controlled trials. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2015 Mar; **54(3)**: 164-74.
- Cortese S, Ferrin M, Brandeis D, Buitelaar J, Daley D, Dittmann RW, Holtmann M, Santosh P, Stevenson J, Stringaris A, Zuddas A, Sonuga-Barke EJ; European ADHD Guidelines Group (EAGG). Cognitive training for attention-deficit/hyperactivity disorder: meta-analysis of clinical and neuropsychological outcomes from randomized controlled trials. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2015 Mar; **54(3)**: 164-74.
- Cortese S, Kelly C, Chabernaud C, Proal E, Di Martino A, Milham MP, *et al.* Toward systems neuroscience of ADHD: a meta-analysis of 55 fMRI studies. *Am J Psychiatry.* 2012 Oct; **169(10)**: 1038-55.
- Cortese S. The neurobiology and genetics of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD): what every clinician should know. *Eur J Paediatr Neurol.* 2012 Sep; **16(5)**: 422-33.
- Cotney J, Muhle RA, Sanders SJ, Liu L, Willsey AJ, Niu W, *et al.* The autism-associated chromatin modifier CHD8 regulates other autism risk genes during human neurodevelopment. *Nat Commun.* 2015 Mar 10; **6**: 6404.
- Crespo-Facorro B, Prieto C, Sainz J. Schizophrenia gene expression profile reverted to normal levels by antipsychotics. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014 Oct 31; **18(4)**. pii: pyu066.
- Crichton A. An inquiry into the nature and origin of mental derangement: comprehending a concise system of the physiology and pathology of the human mind and a history of the passion and their affects. London: T. Cadell & W. Davies; 1798
- Crider A, Pandya CD, Peter D, Ahmed AO, Pillai A. Ubiquitin-proteasome dependent degradation of GABAA α 1 in autism spectrum disorder. *Mol Autism.* 2014 Sep 1; **5**: 45.

- Cristino AS, Williams SM, Hawi Z, An JY, Bellgrove MA, Schwartz CE, *et al.* Neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders represent an interconnected molecular system. *Mol Psychiatry*. 2014 Mar; **19(3)**: 294-301.
- Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, *et al.* Genetic relationship between five psychiatric disorders estimated from genome-wide SNPs. *Nat Genet*. 2013a Sep; **45(9)**: 984-94.
- Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis. *Lancet*. 2013b Apr 20; **381(9875)**: 1371-9.
- Cubillo A, Halari R, Smith A, Taylor E, Rubia K. A review of fronto-striatal and fronto-cortical brain abnormalities in children and adults with Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) and new evidence for dysfunction in adults with ADHD during motivation and attention. *Cortex*. 2012 Feb; **48(2)**: 194-215.
- Cumyn L, French L, Hechtman L. Comorbidity in adults with attention-deficit hyperactivity disorder. *Can J Psychiatry*. 2009 Oct; **54(10)**: 673-83.

D

- Daley D, van der Oord S, Ferrin M, Danckaerts M, Doepfner M, Cortese S, *et al*; European ADHD Guidelines Group. Behavioral interventions in attention-deficit/hyperactivity disorder: a meta-analysis of randomized controlled trials across multiple outcome domains. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2014 Aug; **53(8)**: 835-47, 847.e1-5.
- Dalsgaard S, Kvist AP, Leckman JF, Nielsen HS, Simonsen M. Cardiovascular safety of stimulants in children with attention-deficit/hyperactivity disorder: a nationwide prospective cohort study. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2014 Aug; **24(6)**: 302-10.
- Dalsgaard S, Østergaard SD, Leckman JF, Mortensen PB, Pedersen MG. Mortality in children, adolescents, and adults with attention deficit hyperactivity disorder: a nationwide cohort study. *Lancet*. 2015 May 30; **385(9983)**: 2190-6.
- Danckaerts M, Sonuga-Barke EJ, Banaschewski T, Buitelaar J, Döpfner M, Hollis C, *et al.* The quality of life of children with attention deficit/hyperactivity disorder: a systematic review. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2010 Feb; **19(2)**: 83-105.
- Dantuma NP, Bott LC. The ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases: precipitating factor, yet part of the solution. *Front Mol Neurosci*. 2014 Jul 31; **7**: 70.
- Das D, Cherbuin N, Eastaer S, Anstey KJ. Attention Deficit/Hyperactivity Disorder symptoms and cognitive abilities in the late-life cohort of the PATH through life study. *PLoS One*. 2014 Jan 28; **9(1)**: e86552.
- Datson NA, Speksnijder N, de Jong IE, Steenbergen PJ, Vielsted Christensen K, Potempa K, *et al.* Hippocampal CA1 region shows differential regulation of gene expression in mice displaying extremes in behavioral sensitization to amphetamine: relevance for psychosis susceptibility? *Psychopharmacology (Berl)*. 2011 Oct; **217(4)**: 525-38.

- Davis BN, Hata A. Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell Commun Signal*. 2009 Aug 10; **7**: 18.
- Dawn Teare M, Barrett JH. Genetic linkage studies. *Lancet*. 2005 Sep 17-23; **366(9490)**: 1036-44.
- de Bruijn DR, van Dijk AH, Pfundt R, Hoischen A, Merkx GF, Gradek GA, *et al*. Severe Progressive Autism Associated with Two de novo Changes: A 2.6-Mb 2q31.1 Deletion and a Balanced t(14;21)(q21.1;p11.2) Translocation with Long-Range Epigenetic Silencing of LRFN5 Expression. *Mol Syndromol*. 2010 Feb; **1(1)**: 46-57.
- de Jong S, Newhouse SJ, Patel H, Lee S, Dempster D, Curtis C, *et al*. Immune signatures and disorder-specific patterns in a cross-disorder gene expression analysis. *Br J Psychiatry*. 2016 Sep; **209(3)**: 202-8.
- de Silva MG, Elliott K, Dahl HH, Fitzpatrick E, Wilcox S, Delatycki M, *et al*. Disruption of a novel member of a sodium/hydrogen exchanger family and DOCK3 is associated with an attention deficit hyperactivity disorder-like phenotype. *J Med Genet*. 2003 Oct; **40(10)**: 733-40.
- Dean B, Keriakous D, Scarr E, Thomas EA. Gene expression profiling in Brodmann's area 46 from subjects with schizophrenia. *Aust N Z J Psychiatry*. 2007 Apr; **41(4)**: 308-20.
- Del Campo N, Chamberlain SR, Sahakian BJ, Robbins TW. The roles of dopamine and noradrenaline in the pathophysiology and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*. 2011 Jun 15; **69(12)**: e145-57.
- dela Peña I, Bang M, Lee J, de la Peña JB, Kim BN, Han DH, *et al*. Common prefrontal cortical gene expression profiles between adolescent SHR/NCrI and WKY/NCrI rats which showed inattention behavior. *Behav Brain Res*. 2015 Sep 15; **291**: 268-76.
- Demeter E, Sarter M. Leveraging the cortical cholinergic system to enhance attention. *Neuropharmacology*. 2013 Jan; **64**: 294-304.
- Demontis D, Lescai F, Børglum A, Glerup S, Østergaard SD, Mors O, *et al*. 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*. 2016 Jun; **55(6)**: 521-3.
- Dempster ER, Lerner IM. Heritability of Threshold Characters. *Genetics*. 1950; **35(2)**: 212-36.
- Denhoff E, Laufer MW, Solomons G. Hyperkinetic impulse disorder in children's behavior problems. *Psychosom Med*. 1957 Jan-Feb; **19(1)**: 38-49.
- Dennissen FJ, Kholod N, van Leeuwen FW. The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: culprit, accomplice or victim? *Prog Neurobiol*. 2012 Feb; **96(2)**: 190-207.
- Depue BE, Burgess GC, Bidwell LC, Willcutt EG, Banich MT. Behavioral performance predicts grey matter reductions in the right inferior frontal gyrus in young adults with combined type ADHD. *Psychiatry Res*. 2010 Jun 30; **182(3)**: 231-7.
- Derrien B, Genschik P. When RNA and protein degradation pathways meet. *Front Plant Sci*. 2014 Apr 23; **5**: 161.

- Dickstein SG, Bannon K, Castellanos FX, Milham MP. The neural correlates of attention deficit hyperactivity disorder: an ALE meta-analysis. *J Child Psychol Psychiatry*. 2006; **47**: 1051–1062.
- Ding X, Sun B, Huang J, Xu L, Pan J, Fang C, *et al*. The role of miR-182 in regulating pineal CLOCK expression after hypoxia-ischemia brain injury in neonatal rats. *Neurosci Lett*. 2015 Mar 30; **591**: 75-80.
- D'Onofrio BM, Van Hulle CA, Waldman ID, Rodgers JL, Harden KP, Rathouz PJ, *et al*. Smoking during pregnancy and offspring externalizing problems: an exploration of genetic and environmental confounds. *Dev Psychopathol*. 2008 Winter; **20(1)**: 139-64.
- Döpfner M, Frölich J, Lehmkuhl G. Hyperkinetische Störungen. In: Döpfner M, Lehmkuhl G, Peterman F. Reihe Leitfaden Kinder- und Jugendpsychotherapie, Bd. 1. Göttingen: Hogrefe; 2000.
- Douglas VI. Stop, look and listen: the problem of sustained attention and impulse control in hyperactive and normal children. *Can J Behav Sci*. 1972 Oct; **4(4)**: 259–282
- Dramsahl M, Ersland L, Plessen KJ, Haavik J, Hugdahl K, Specht K. Adults with attention-deficit/hyperactivity disorder - a brain magnetic resonance spectroscopy study. *Front Psychiatry*. 2011 Nov 23; **2**: 65.
- Durston S, Davidson MC, Mulder MJ, Spicer JA, Galvan A, Tottenham N, *et al*. Neural and behavioral correlates of expectancy violations in attention-deficit hyperactivity disorder. *J Child Psychol Psychiatry*. 2007 Sep; **48(9)**: 881-9.
- Durston S, Hulshoff Pol HE, Schnack HG, Buitelaar JK, Steenhuis MP, *et al*. Magnetic resonance imaging of boys with attention-deficit/hyperactivity disorder and their unaffected siblings. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2004 Mar; **43(3)**: 332-40.
- Durston S, van Belle J, de Zeeuw P. Differentiating frontostriatal and fronto-cerebellar circuits in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*. 2011 Jun 15; **69(12)**: 1178-84.
- Dwoskin LP, Rauhut AS, King-Pospisil KA, Bardo MT. Review of the pharmacology and clinical profile of bupropion, an antidepressant and tobacco use cessation agent. *CNS Drug Rev*. 2006 Fall-Winter; **12(3-4)**: 178-207.

E

- Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife*. 2015 Aug 12; **4**.
- Ebaugh FG. Neuropsychiatric sequelae of acute epidemic encephalitis in children. *Am J Dis Child*. 1923; **25**: 89–97.
- Ebejer JL, Duffy DL, van der Werf J, Wright MJ, Montgomery G, Gillespie NA, *et al*. Genome-wide association study of inattention and hyperactivity-impulsivity measured as quantitative traits. *Twin Res Hum Genet*. 2013 Apr; **16(2)**: 560-74.

- Elia J, Gai X, Xie HM, Perin JC, Geiger E, Glessner JT, *et al.* Rare structural variants found in attention-deficit hyperactivity disorder are preferentially associated with neurodevelopmental genes. *Mol Psychiatry*. 2010 Jun; **15(6)**: 637-46.
- Elia J, Glessner JT, Wang K, Takahashi N, Shtir CJ, Hadley D, *et al.* Genome-wide copy number variation study associates metabotropic glutamate receptor gene networks with attention deficit hyperactivity disorder. *Nat Genet*. 2011 Dec 4; **44(1)**: 78-84.
- Ellison-Wright I, Ellison-Wright Z, Bullmore E. Structural brain change in Attention Deficit Hyperactivity Disorder identified by meta-analysis. *BMC Psychiatry*. 2008 Jun 30; **8**: 51.
- Emilsson V, Thorleifsson G, Zhang B, Leonardson AS, Zink F, Zhu J, *et al.* Genetics of gene expression and its effect on disease. *Nature*. 2008 Mar 27; **452(7186)**: 423-8.
- Evangelou E, Trikalinos TA, Salanti G, Ioannidis JP. Family-based versus unrelated case-control designs for genetic associations. *PLoS Genet*. 2006 Aug; **2(8)**: e123.

F

- Fair DA, Bathula D, Nikolas MA, Nigg JT. Distinct neuropsychological subgroups in typically developing youth inform heterogeneity in children with ADHD. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Apr 24; **109(17)**: 6769-74.
- Fair DA, Nigg JT, Iyer S, Bathula D, Mills KL, Dosenbach NU, *et al.* Distinct neural signatures detected for ADHD subtypes after controlling for micromovements in resting state functional connectivity MRI data. *Front Syst Neurosci*. 2013 Feb 4; **6**: 80.
- Fair DA, Posner J, Nagel BJ, Bathula D, Dias TG, Mills KL, *et al.* Atypical default network connectivity in youth with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*. 2010 Dec 15; **68(12)**: 1084-91.
- Fairbrother WG, Yeh RF, Sharp PA, Burge CB. Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science*. 2002 Aug 9; **297(5583)**: 1007-13.
- Faraone SV, Antshel KM. Towards an evidence-based taxonomy of nonpharmacologic treatments for ADHD. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*. 2014 Oct; **23(4)**: 965-72.
- Faraone SV, Asherson P, Banaschewski T, Biederman J, Buitelaar JK, Ramos-Quiroga JA, *et al.* Attention-deficit/hyperactivity disorder. *Nat Rev Dis Primers*. 2015 Aug 6; **1**: 15020.
- Faraone SV, Biederman J, Mick E. The age-dependent decline of attention deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis of follow-up studies. *Psychol Med*. 2006a Feb; **36(2)**: 159-65.
- Faraone SV, Biederman J, Monuteaux MC. Toward guidelines for pedigree selection in genetic studies of attention deficit hyperactivity disorder. *Genet Epidemiol*. 2000 Jan; **18(1)**: 1-16.
- Faraone SV, Biederman J, Morley CP, Spencer TJ. Effect of stimulants on height and weight: a review of the literature. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2008 Sep; **47(9)**: 994-1009.
- Faraone SV, Biederman J, Spencer TJ, Aleardi M. Comparing the efficacy of medications for ADHD using meta-analysis. *MedGenMed*. 2006b Oct 5; **8(4)**: 4.

- Faraone SV, Biederman J, Wozniak J. Examining the comorbidity between attention deficit hyperactivity disorder and bipolar I disorder: a meta-analysis of family genetic studies. *Am J Psychiatry*. 2012 Dec; **169(12)**: 1256-66.
- Faraone SV, Biederman J. Can Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Onset Occur in Adulthood? *JAMA Psychiatry*. 2016 Jul 1; **73(7)**: 655-6.
- Faraone SV, Buitelaar J. Comparing the efficacy of stimulants for ADHD in children and adolescents using meta-analysis. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2010 Apr; **19(4)**: 353-64.
- Faraone SV, Glatt SJ. A comparison of the efficacy of medications for adult attention-deficit/hyperactivity disorder using meta-analysis of effect sizes. *J Clin Psychiatry*. 2010 Jun; **71(6)**: 754-63.
- Faraone SV, McBurnett K, Sallee FR, Steeber J, López FA. Guanfacine extended release: a novel treatment for attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents. *Clin Ther*. 2013 Nov; **35(11)**: 1778-93.
- Faraone SV, Mick E. Molecular genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr Clin North Am*. 2010 Mar; **33(1)**: 159-80.
- Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE, Smoller JW, Goralnick JJ, Holmgren MA, *et al*. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*. 2005 Jun 1; **57(11)**: 1313-23.
- Faraone SV, Sergeant J, Gillberg C, Biederman J. The worldwide prevalence of ADHD: is it an American condition? *World Psychiatry*. 2003 Jun; **2(2)**: 104-13.
- Faraone SV, Spencer T, Aleardi M, Pagano C, Biederman J. Meta-analysis of the efficacy of methylphenidate for treating adult attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychopharmacol*. 2004 Feb; **24(1)**: 24-9.
- Fassbender C, Schweitzer JB. Is there evidence for neural compensation in attention deficit hyperactivity disorder? A review of the functional neuroimaging literature. *Clin Psychol Rev*. 2006 Aug; **26(4)**: 445-65.
- Fayyad J, De Graaf R, Kessler R, Alonso J, Angermeyer M, Demyttenaere K, De Girolamo G, Haro JM, Karam EG, Lara C, Lépine JP, Ormel J, Posada-Villa J, Zaslavsky AM, Jin R. Cross-national prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder. *Br J Psychiatry*. 2007 May; **190**: 402-9.
- Feng Y, Cheng D, Zhang C, Li Y, Zhang Z, Wang J, *et al*. Association of PDE4B Polymorphisms with Susceptibility to Schizophrenia: A Meta-Analysis of Case-Control Studies. *PLoS One*. 2016 Jan 12; **11(1)**: e0147092.
- Fernández-Castillo N, Cabana-Domínguez J, Soriano J, Sánchez-Mora C, Roncero C, Grau-López L, *et al*. Transcriptomic and genetic studies identify NFAT5 as a candidate gene for cocaine dependence. *Transl Psychiatry*. 2015 Oct 27; **5**: e667.
- Ferreira MA, O'Donovan MC, Meng YA, Jones IR, Ruderfer DM, Jones L, *et al*. Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. *Nat Genet*. 2008 Sep; **40(9)**: 1056-8.
- Fiks AG, Mayne S, Debartolo E, Power TJ, Guevara JP. Parental preferences and goals regarding ADHD treatment. *Pediatrics*. 2013 Oct; **132(4)**: 692-702.

- Fındıklı E, Camkurt MA, Karaaslan MF, Kurutas EB, Altun H, İzci F, *et al.* Serum levels of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER1) in drug-naive patients with generalized anxiety disorder. *Psychiatry Res.* 2016 Oct 30; **244**: 312-6.
- Fleckenstein AE, Volz TJ, Riddle EL, Gibb JW, Hanson GR. New insights into the mechanism of action of amphetamines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:681-98.
- Fliers EA, Franke B, Lambregts-Rommelse NN, Altink ME, Buschgens CJ, Nijhuis-van der Sanden MW, *et al.* Undertreatment of Motor Problems in Children with ADHD. *Child Adolesc Ment Health.* 2009 Aug 21; **15(2)**: 85-90.
- Fliers EA, Vasquez AA, Poelmans G, Rommelse N, Altink M, Buschgens C, *et al.* Genome-wide association study of motor coordination problems in ADHD identifies genes for brain and muscle function. *World J Biol Psychiatry.* 2012 Mar; **13(3)**: 211-22.
- Forero DA, Arboleda GH, Vasquez R, Arboleda H. Candidate genes involved in neural plasticity and the risk for attention-deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis of 8 common variants. *J Psychiatry Neurosci.* 2009 Sep; **34(5)**: 361-6.
- Franke B, Faraone SV, Asherson P, Buitelaar J, Bau CH, Ramos-Quiroga JA, *et al.* International Multicentre persistent ADHD CollaboraTion. The genetics of attention deficit/hyperactivity disorder in adults, a review. *Mol Psychiatry.* 2012 Oct; **17(10)**: 960-87.
- Franke B, Neale BM, Faraone SV. Genome-wide association studies in ADHD. *Hum Genet.* 2009 Jul; **126(1)**: 13-50.
- Frazier TW, Youngstrom EA, Glutting JJ, Watkins MW. ADHD and achievement: meta-analysis of the child, adolescent, and adult literatures and a concomitant study with college students. *J Learn Disabil.* 2007 Jan-Feb; **40(1)**: 49-65.
- Fredriksen M, Halmøy A, Faraone SV, Haavik J. Long-term efficacy and safety of treatment with stimulants and atomoxetine in adult ADHD: a review of controlled and naturalistic studies. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2013 Jun; **23(6)**: 508-27.
- Frodil T, Skokauskas N. Meta-analysis of structural MRI studies in children and adults with attention deficit hyperactivity disorder indicates treatment effects. *Acta Psychiatr Scand.* 2012 Feb; **125(2)**: 114-26.
- Fromer M, Roussos P, Sieberts SK, Johnson JS, Kavanagh DH, Perumal TM, *et al.* Gene expression elucidates functional impact of polygenic risk for schizophrenia. *Nat Neurosci.* 2016 Nov; **19(11)**: 1442-1453.
- Furth KE, Mastwal S, Wang KH, Buonanno A, Vullhorst D. Dopamine, cognitive function, and gamma oscillations: role of D4 receptors. *Front Cell Neurosci.* 2013 Jul 2; **7**: 102.
- Furukawa E, Bado P, Tripp G, Mattos P, Wickens JR, Bramati IE, *et al.* Abnormal striatal BOLD responses to reward anticipation and reward delivery in ADHD. *PLoS One.* 2014 Feb 26; **9(2)**: e89129.

G

- Gai X, Xie HM, Perin JC, Takahashi N, Murphy K, Wenocur AS, *et al.* Rare structural variation of synapse and neurotransmission genes in autism. *Mol Psychiatry*. 2012 Apr; **17(4)**: 402-11.
- Gainetdinov RR, Wetsel WC, Jones SR, Levin ED, Jaber M, Caron MG. Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity. *Science*. 1999; **283**: 397-401.
- Gamazon ER, Badner JA, Cheng L, Zhang C, Zhang D, Cox NJ, *et al.* Enrichment of cis-regulatory gene expression SNPs and methylation quantitative trait loci among bipolar disorder susceptibility variants. *Mol Psychiatry*. 2013 Mar; **18(3)**: 340-6.
- Garbett K, Ebert PJ, Mitchell A, Lintas C, Manzi B, Mirnics K, *et al.* Immune transcriptome alterations in the temporal cortex of subjects with autism. *Neurobiol Dis*. 2008 Jun; **30(3)**: 303-11.
- García-Fuster MJ, Díez-Alarcia R, Ferrer-Alcón M, La Harpe R, Meana JJ, García-Sevilla JA. FADD adaptor and PEA-15/ERK1/2 partners in major depression and schizophrenia postmortem brains: basal contents and effects of psychotropic treatments. *Neuroscience*. 2014 Sep 26; **277**: 541-51.
- Garriock HA, Kraft JB, Shyn SI, Peters EJ, Yokoyama JS, Jenkins GD, *et al.* A genomewide association study of citalopram response in major depressive disorder. *Biol Psychiatry*. 2010 Jan 15; **67(2)**: 133-8.
- Gauderman WJ, Witte JS, Thomas DC. Family-based association studies. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 1999; **(26)**: 31-7.
- Gaughwin PM, Ciesla M, Lahiri N, Tabrizi SJ, Brundin P, Bjorkqvist M. Hsa-miR-34b is a plasma-stable microRNA that is elevated in pre-manifest Huntington's disease. *Hum Mol Genet*. 2011; **20**: 2225-2237.
- Geaghan M, Cairns MJ. MicroRNA and Posttranscriptional Dysregulation in Psychiatry. *Biol Psychiatry*. 2015 Aug 15; **78(4)**: 231-9.
- GENDEP Investigators; MARS Investigators; STAR*D Investigators. Common genetic variation and antidepressant efficacy in major depressive disorder: a meta-analysis of three genome-wide pharmacogenetic studies. *Am J Psychiatry*. 2013 Feb; **170(2)**: 207-17.
- Georgi B, Craig D, Kember RL, Liu W, Lindquist I, Nasser S, *et al.* Genomic view of bipolar disorder revealed by whole genome sequencing in a genetic isolate. *PLoS Genet*. 2014 Mar 13; **10(3)**: e1004229.
- Georgieva L, Rees E, Moran JL, Chambert KD, Milanova V, Craddock N, *et al.* De novo CNVs in bipolar affective disorder and schizophrenia. *Hum Mol Genet*. 2014 Dec 15; **23(24)**: 6677-83.
- Ghuman JK, Ghuman HS. Pharmacologic intervention for attention-deficit hyperactivity disorder in preschoolers: is it justified? *Paediatr Drugs*. 2013 Feb; **15(1)**: 1-8.
- Gilad Y, Rifkin SA, Pritchard JK. Revealing the architecture of gene regulation: the promise of eQTL studies. *Trends Genet*. 2008 Aug; **24(8)**: 408-15.
- Giusti L, Ciregia F, Mazzoni MR, Lucacchini A. Proteomics insight into psychiatric disorders: an update on biological fluid biomarkers. *Expert Rev Proteomics*. 2016 Sep 8:1-10. [En premsa]

- Gizer IR, Ficks C, Waldman ID. Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet.* 2009 Jul; **126(1)**: 51-90.
- Global Burden of Disease Study 2010 Collaborators. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 2012 Dec 15; **380(9859)**: 2197-223.
- Global Burden of Disease Study 2013 Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2015 Aug 22; **386(9995)**: 743-800.
- Godnic I, Zorc M, Jevsinek Skok D, Calin GA, Horvat S, Dovc P, *et al.* Genome-wide and species-wide in silico screening for intragenic MicroRNAs in human, mouse and chicken. *PLoS One.* 2013 Jun 6; **8(6)**: e65165.
- Goldstein I, Lerer E, Laiba E, Mallet J, Mujaheed M, Laurent C, *et al.* Association between sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase alpha isoforms and bipolar disorders. *Biol Psychiatry.* 2009 Jun 1; **65(11)**: 985-91.
- Graetz BW, Sawyer MG, Hazell PL, Arney F, Baghurst P. Validity of DSM-IVADHD subtypes in a nationally representative sample of Australian children and adolescents. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2001 Dec; **40(12)**: 1410-7.
- Greven CU, Bralten J, Mennes M, O'Dwyer L, van Hulzen KJ, Rommelse N, *et al.* Developmentally stable whole-brain volume reductions and developmentally sensitive caudate and putamen volume alterations in those with attention-deficit/hyperactivity disorder and their unaffected siblings. *JAMA Psychiatry.* 2015 May; **72(5)**: 490-9.
- Groenman AP, Oosterlaan J, Rommelse N, Franke B, Roeyers H, Oades RD, *et al.* Substance use disorders in adolescents with attention deficit hyperactivity disorder: a 4-year follow-up study. *Addiction.* 2013 Aug; **108(8)**: 1503-11.
- Gross MD. Origin of stimulant use for treatment of attention deficit disorder. *Am J Psychiatry.* 1995 Feb; **152(2)**: 298-9.
- Grünblatt E, Geissler J, Jacob CP, Renner T, Müller M, Bartl J *et al.* Pilot study: potential transcription markers for adult attention-deficit hyperactivity disorder in whole blood. *Atten Defic Hyperact Disord.* 2012 Jun; **4(2)**: 77-84.
- Gu CC, Yu K, Rao DC. Characterization of LD structures and the utility of HapMap in genetic association studies. *Adv Genet.* 2008; **60**: 407-35.
- Guimarães AP, Schmitz M, Polanczyk GV, Zeni C, Genro J, Roman T, *et al.* Further evidence for the association between attention deficit/hyperactivity disorder and the serotonin receptor 1B gene. *J Neural Transm (Vienna).* 2009 Dec; **116(12)**: 1675-80.
- Guldborg-Kjär T, Johansson B. Old people reporting childhood AD/HD symptoms: retrospectively self-rated AD/HD symptoms in a population-based Swedish sample aged 65-80. *Nord J Psychiatry.* 2009; **63(5)**: 375-82.

Gururajan A, Naughton ME, Scott KA, O'Connor RM, Moloney G, Clarke G, *et al.* MicroRNAs as biomarkers for major depression: a role for let-7b and let-7c. *Transl Psychiatry*. 2016 Aug 2; **6(8)**: e862.

H

Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Aug; **15(8)**: 509-24.

Halperin E, Stephan DA. SNP imputation in association studies. *Nat Biotechnol*. 2009 Apr; **27(4)**: 349-51.

Halperin JM, Newcorn JH, Schwartz ST, Sharma V, Siever LJ, Koda VH, *et al.* Age-related changes in the association between serotonergic function and aggression in boys with ADHD. *Biol Psychiatry*. 1997; **41**: 682-89.

Hammerness P, Biederman J, Petty C, Henin A, Moore CM. Brain biochemical effects of methylphenidate treatment using proton magnetic spectroscopy in youth with attention-deficit hyperactivity disorder: a controlled pilot study. *CNS Neurosci Ther*. 2012 Jan; **18(1)**: 34-40.

Hamshere ML, Langley K, Martin J, Agha SS, Stergiakouli E, Anney RJ, *et al.* High loading of polygenic risk for ADHD in children with comorbid aggression. *Am J Psychiatry*. 2013 Aug; **170(8)**: 909-16.

Han M, Zheng Y. Comprehensive analysis of single nucleotide polymorphisms in human microRNAs. *PLoS One*. 2013 Nov 5; **8(11)**: e78028.

Haramati S, Navon I, Issler O, Ezra-Nevo G, Gil S, Zwang R. *et al.* MicroRNA as repressors of stress-induced anxiety: the case of amygdalar miR-34. *J Neurosci*. 2011; **31**: 14191-14203.

Harold GT, Leve LD, Barrett D, Elam K, Neiderhiser JM, Natsuaki MN, *et al.* Biological and rearing mother influences on child ADHD symptoms: revisiting the developmental interface between nature and nurture. *J Child Psychol Psychiatry*. 2013 Oct; **54(10)**: 1038-46.

Hart EL, Lahey BB, Loeber R, Applegate B, Frick PJ. Developmental change in attention-deficit hyperactivity disorder in boys: a four-year longitudinal study. *J Abnorm Child Psychol*. 1995 Dec; **23(6)**: 729-49.

Hart H, Radua J, Mataix-Cols D, Rubia K. Meta-analysis of fMRI studies of timing in attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Neurosci Biobehav Rev*. 2012 Nov; **36(10)**: 2248-56.

Hart H, Radua J, Nakao T, Mataix-Cols D, Rubia K. Meta-analysis of functional magnetic resonance imaging studies of inhibition and attention in attention-deficit/hyperactivity disorder: exploring task-specific, stimulant medication, and age effects. *JAMA Psychiatry*. 2013 Feb; **70(2)**: 185-98.

Hatzimanolis A, McGrath JA, Wang R, Li T, Wong PC, Nestadt G, *et al.* Multiple variants aggregate in the neuregulin signaling pathway in a subset of schizophrenia patients. *Transl Psychiatry*. 2013 May 28; **3**: e264.

Hawi Z, Cummins TD, Tong J, Arcos-Burgos M, Zhao Q, Matthews N, *et al.* Rare DNA variants in the brain-derived neurotrophic factor gene increase risk for attention-deficit hyperactivity disorder: a next-generation sequencing study. *Mol Psychiatry*. 2017 Apr; **22(4)**: 580-584.

- Hawi Z, Cummins TD, Tong J, Johnson B, Lau R, Samarrai W, *et al.* The molecular genetic architecture of attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*. 2015 Mar; **20(3)**: 289-97.
- Hawi Z, Dring M, Kirley A, Foley D, Kent L, Craddock N, *et al.* Serotonergic system and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): a potential susceptibility locus at the 5-HT(1B) receptor gene in 273 nuclear families from a multi-centre sample. *Mol Psychiatry*. 2002; **7(7)**: 718-25.
- Hawi Z, Matthews N, Barry E, Kirley A, Wagner J, Wallace RH, *et al.* A high density linkage disequilibrium mapping in 14 noradrenergic genes: evidence of association between SLC6A2, ADRA1B and ADHD. *Psychopharmacology (Berl)*. 2013 Feb; **225(4)**: 895-902.
- Hawkey E, Nigg JT. Omega-3 fatty acid and ADHD: blood level analysis and meta-analytic extension of supplementation trials. *Clin Psychol Rev*. 2014 Aug; **34(6)**: 496-505.
- He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004 Jul; **5(7)**: 522-31.
- Hedrick A, Lee Y, Wallace GL, Greenstein D, Clasen L, Giedd JN, *et al.* Autism risk gene MET variation and cortical thickness in typically developing children and adolescents. *Autism Res*. 2012 Dec; **5(6)**: 434-9.
- Hegde AN. Proteolysis, synaptic plasticity and memory. *Neurobiol Learn Mem*. 2017 Feb; **138**: 98-110.
- Hegde AN. The ubiquitin-proteasome pathway and synaptic plasticity. *Learn Mem*. 2010; **17**: 314-27.
- Heijtz RD, Alexeyenko A, Castellanos FX. Calcyon mRNA expression in the frontal-striatal circuitry and its relationship to vesicular processes and ADHD. *Behav Brain Funct*. 2007 Jul 10; **3**: 33.
- Herberth M, Koethe D, Levin Y, Schwarz E, Krzyszton ND, Schoeffmann S, *et al.* Peripheral profiling analysis for bipolar disorder reveals markers associated with reduced cell survival. *Proteomics*. 2011 Jan; **11(1)**: 94-105.
- Herpertz SC, Huebner T, Marx I, Vloet TD, Fink GR, Stoecker T, *et al.* Emotional processing in male adolescents with childhood-onset conduct disorder. *J Child Psychol Psychiatry*. 2008 Jul; **49(7)**: 781-91.
- Higg JT, Barkley RA. Attention Deficit/Hyperactivity Disorder. In: Mash EJ, Barkley RA. *Child Psychopathology*. New York: The Guilford Press; 2014.
- Hill WD, Davies G, Liewald DC, Payton A, McNeil CJ, Whalley LJ, *et al.* Examining non-syndromic autosomal recessive intellectual disability (NS-ARID) genes for an enriched association with intelligence differences. *Intelligence*. 2016 Jan-Feb; **54**: 80-89.
- Hinney A, Scherag A, Jarick I, Albayrak Ö, Pütter C, Pechlivanis S, *et al*; Psychiatric GWAS Consortium: ADHD subgroup. Genome-wide association study in German patients with attention deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2011 Dec; **156B(8)**: 888-97.
- Hippocrates: Aphorisms. In: Francis A. *The Genuine Works of Hippocrates*. London: The Sydenham Society; 1849.
- Holtmann M, Sonuga-Barke E, Cortese S, Brandeis D. Neurofeedback for ADHD: a review of current evidence. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*. 2014 Oct; **23(4)**: 789-806.

- Hong EP, Park JW. Sample size and statistical power calculation in genetic association studies. *Genomics Inform.* 2012 Jun;10(2):117-22.
- Hoogendoorn B, Coleman SL, Guy CA, Smith K, Bowen T, Buckland PR, *et al.* Functional analysis of human promoter polymorphisms. *Hum Mol Genet.* 2003 Sep 15; **12(18)**: 2249-54.
- Hoogman M, Bralten J, Hibar DP, Mennes M, Zwiers MP, Schweren LS, *et al.* Subcortical brain volume differences in participants with attention deficit hyperactivity disorder in children and adults: a cross-sectional mega-analysis. *Lancet Psychiatry.* 2017 Apr; **4(4)**: 310-19.
- Hoogman M, Rijpkema M, Janss L, Brunner H, Fernandez G, Buitelaar J, *et al.* Current self-reported symptoms of attention deficit/hyperactivity disorder are associated with total brain volume in healthy adults. *PLoS One.* 2012; **7(2)**: e31273.
- Horn D, Prescott T, Houge G, Brække K, Rosendahl K, Nishimura G, *et al.* A Novel Oculo-Skeletal syndrome with intellectual disability caused by a particular MAB21L2 mutation. *Eur J Med Genet.* 2015 Aug; **58(8)**: 387-91.
- Huang F, Long Z, Chen Z, Li J, Hu Z, Qiu R, *et al.* Investigation of Gene Regulatory Networks Associated with Autism Spectrum Disorder Based on MiRNA Expression in China. *PLoS One.* 2015 Jun 10; **10(6)**: e0129052.
- Hudziak JJ, Heath AC, Madden PF, Reich W, Bucholz KK, Slutske W, *et al.* Latent class and factor analysis of DSM-IV ADHD: a twin study of female adolescents. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 1998 Aug; **37(8)**: 848-57.
- ## I
- Ignacio C, Hicks SD, Burke P, Lewis L, Szombathyne-Meszaros Z, Middleton FA. Alterations in serum microRNA in humans with alcohol use disorders impact cell proliferation and cell death pathways and predict structural and functional changes in brain. *BMC Neurosci.* 2015 Sep 5; **16**: 55.
- Iossifov I, O'Roak BJ, Sanders SJ, Ronemus M, Krumm N, Levy D, *et al.* The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature.* 2014 Nov 13; **515(7526)**: 216-21.
- Ishizuka T, Murotani T, Yamatodani A. Action of modafinil through histaminergic and orexinergic neurons. *Vitam Horm.* 2012; **89**: 259-78.
- Issler O, Chen A. Determining the role of microRNAs in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2015 Apr; **16(4)**: 201-12.
- Iwamoto K, Ueda J, Bundo M, Kojima T, Kato T. Survey of the effect of genetic variations on gene expression in human prefrontal cortex and its application to genetics of psychiatric disorders. *Neurosci Res.* 2011 Jun; **70(2)**: 238-42.

J

- Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* 2003 Mar; **33 Suppl**: 245-54.
- Jain R, Segal S, Kollins SH, Khayrallah M. Clonidine extended-release tablets for pediatric patients with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2011 Feb; **50(2)**: 171-9.
- James A, Lai FH, Dahl C. Attention deficit hyperactivity disorder and suicide: a review of possible associations. *Acta Psychiatr Scand.* 2004 Dec; **110(6)**: 408-15.
- James W. *The Principles of Psychology.* London: Dover; 1890.
- Jarick I, Volckmar AL, Pütter C, Pechlivanis S, Nguyen TT, Dauvermann MR, *et al.* Genome-wide analysis of rare copy number variations reveals PARK2 as a candidate gene for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry.* 2014 Jan; **19(1)**: 115-21.
- Jefferson JW, Pradko JF, Muir KT. Bupropion for major depressive disorder: Pharmacokinetic and formulation considerations. *Clin Ther.* 2005 Nov; **27(11)**: 1685-95.
- Jensen CM, Steinhausen HC. Comorbid mental disorders in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder in a large nationwide study. *Atten Defic Hyperact Disord.* 2015 Mar; **7(1)**: 27-38.
- Jensen KP, Covault J, Conner TS, Tennen H, Kranzler HR, Furneaux HM. A common polymorphism in serotonin receptor 1B mRNA moderates regulation by miR-96 and associates with aggressive human behaviors. *Mol Psychiatry.* 2009 Apr; **14(4)**: 381-9.
- Ji L, Chauhan A, Brown WT, Chauhan V. Increased activities of Na⁺/K⁺-ATPase and Ca²⁺/Mg²⁺-ATPase in the frontal cortex and cerebellum of autistic individuals. *Life Sci.* 2009 Dec 16; **85(23-26)**: 788-93.
- Jin Y, Lee CG. Single Nucleotide Polymorphisms Associated with MicroRNA Regulation. *Biomolecules.* 2013 Apr 9; **3(2)**: 287-302.
- Juhila J, Sipilä T, Icaý K, Nicorici D, Ellonen P, Kallio A, *et al.* MicroRNA expression profiling reveals miRNA families regulating specific biological pathways in mouse frontal cortex and hippocampus. *PLoS One.* 2011; **6(6)**: e21495.

K

- Kahbazi M, Ghoreishi A, Rahiminejad F, Mohammadi MR, Kamalipour A, Akhondzadeh S. A randomized, double-blind and placebo-controlled trial of modafinil in children and adolescents with attention deficit and hyperactivity disorder. *Psychiatry Res.* 2009 Aug 15; **168(3)**: 234-7.
- Kähler AK, Otnaess MK, Wirgenes KV, Hansen T, Jönsson EG, Agartz I, *et al.* Association study of PDE4B gene variants in Scandinavian schizophrenia and bipolar disorder multicenter case-control samples. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2010 Jan 5; **153B(1)**: 86-96.

- Kaplan G, Newcorn JH. Pharmacotherapy for child and adolescent attention-deficit hyperactivity disorder. *Pediatr Clin North Am*. 2011 Feb; **58(1)**: 99-120, xi.
- Karszen AM, Her S, Li JZ, Patel PD, Meng F, Bunney WE Jr, *et al*. Stress-induced changes in primate prefrontal profiles of gene expression. *Mol Psychiatry*. 2007 Dec; **12(12)**: 1089-102.
- Kasperek T, Theiner P, Filova A. Neurobiology of ADHD From Childhood to Adulthood: Findings of Imaging Methods. *J Atten Disord*. 2015 Nov; **19(11)**:931-43.
- Kastenberger I, Schwarzer C. GPER1 (GPR30) knockout mice display reduced anxiety and altered stress response in a sex and paradigm dependent manner. *Horm Behav*. 2014 Sep; **66(4)**: 628-36.
- Kendler KS. What psychiatric genetics has taught us about the nature of psychiatric illness and what is left to learn. *Mol Psychiatry*. 2013 Oct; **18(10)**: 1058-66.
- Kessler JW. History of minimal brain dysfunctions. In: Rie HE, Rie ED. *Handbook of minimal brain dysfunctions: a critical view*. New York: Wiley; 1980. p 18–51
- Kessler RC, Adler L, Barkley R, Biederman J, Conners CK, Demler O, *et al*. The prevalence and correlates of adult ADHD in the United States: results from the National Comorbidity Survey Replication. *Am J Psychiatry*. 2006 Apr; **163(4)**: 716-23.
- Kessler RC, Adler LA, Barkley R, Biederman J, Conners CK, Faraone SV, *et al*. Patterns and predictors of attention-deficit/hyperactivity disorder persistence into adulthood: results from the national comorbidity survey replication. *Biol Psychiatry*. 2005 Jun 1; **57(11)**: 1442-51.
- Kim DS, Burt AA, Ranchalis JE, Wilmot B, Smith JD, Patterson K, *et al*. Sequencing of sporadic Attention-Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) identifies novel and potentially pathogenic de novo variants and excludes overlap with genes associated with autism spectrum disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2017 Mar 22. [En premsa]
- Kim K, Zakharkin SO, Allison DB. Expectations, validity, and reality in gene expression profiling. *J Clin Epidemiol*. 2010 Sep; **63(9)**: 950-9.
- Kim Y, Xia K, Tao R, Giusti-Rodriguez P, Vladimirov V, van den Oord E, *et al*. A metaanalysis of gene expression quantitative trait loci in brain. *Transl Psychiatry*. 2014; **4**: e459.
- Klein RG, Mannuzza S, Olazagasti MA, Roizen E, Hutchison JA, Lashua EC, *et al*. Clinical and functional outcome of childhood attention-deficit/hyperactivity disorder 33 years later. *Arch Gen Psychiatry*. 2012 Dec; **69(12)**: 1295-303.
- Klingberg T, Fernell E, Olesen PJ, Johnson M, Gustafsson P, Dahlström K, *et al*. Computerized training of working memory in children with ADHD - a randomized, controlled trial. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2005 Feb; **44(2)**: 177-86.
- Knouse LE, Safren SA. Current status of cognitive behavioral therapy for adult attention-deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr Clin North Am*. 2010 Sep; **33(3)**: 497-509.
- Konrad K, Eickhoff SB. Is the ADHD brain wired differently? A review on structural and functional connectivity in attention deficit hyperactivity disorder. *Hum Brain Mapp*. 2010 Jun; **31(6)**: 904-16.

- Kooij JJ, Huss M, Asherson P, Akehurst R, Beusterien K, French A, *et al.* Distinguishing comorbidity and successful management of adult ADHD. *J Atten Disord.* 2012 Jul; **16(5 Suppl)**: 3S-19S.
- Kooij SJ, Bejerot S, Blackwell A, Caci H, Casas-Brugué M, Carpentier PJ, *et al.* European consensus statement on diagnosis and treatment of adult ADHD: The European Network Adult ADHD. *BMC Psychiatry.* 2010 Sep 3; **10**: 67.
- Kosillo P, Zhang YF, Threlfell S, Cragg SJ. Cortical Control of Striatal Dopamine Transmission via Striatal Cholinergic Interneurons. *Cereb Cortex.* 2016 Aug 27. [Epub ahead of print]
- Kramer F, Pollnow H. Über eine hyperkinetische Erkrankung im Kindesalter. *Msschr Psychiat Neurol.* 1932; **82**: 21–40
- Kreppner JM, O'Connor TG, Rutter M; English and Romanian Adoptees Study Team. Can inattention/overactivity be an institutional deprivation syndrome? *J Abnorm Child Psychol.* 2001 Dec; **29(6)**: 513-28.
- Krezel W, Ghyselinck N, Samad TA, Dupé V, Kastner P, Borrelli E, *et al.* Impaired locomotion and dopamine signaling in retinoid receptor mutant mice. *Science.* 1998 Feb 6; **279(5352)**: 863-7.
- Kuntsi J, Klein C. Intraindividual variability in ADHD and its implications for research of causal links. *Curr Top Behav Neurosci.* 2012; **9**: 67-91.
- Kuntsi J, Neale BM, Chen W, Faraone SV, Asherson P. The IMAGE project: methodological issues for the molecular genetic analysis of ADHD. *Behav Brain Funct.* 2006 Aug 3; **2**: 27.

L

- Labadorf A, Hoss AG, Lagomarsino V, Latourelle JC, Hadzi TC, Bregu J, Correction: RNA Sequence Analysis of Human Huntington Disease Brain Reveals an Extensive Increase in Inflammatory and Developmental Gene Expression. *PLoS One.* 2015 Dec 4; **10(12)**: e0143563. Erratum a: *PLoS One.* 2016; **11(7)**: e0160295.
- Lahey BB, Applegate B, McBurnett K, Biederman J, Greenhill L, Hynd GW, *et al.* DSM-IV field trials for attention deficit hyperactivity disorder in children and adolescents. *Am J Psychiatry.* 1994; **151**: 1673–85
- Lahey BB, Pelham WE, Loney J, Lee SS, Willcutt E. Instability of the DSM-IV Subtypes of ADHD from preschool through elementary school. *Arch Gen Psychiatry.* 2005 Aug; **62(8)**: 896-902.
- Lahey BB, Pelham WE, Schaugency EA, Atkins MS, Murphy HA, Hynd G, Russo M, Hartdagen S, Lorys-Vernon A. Dimensions and types of attention deficit disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 1988 May; **27(3)**: 330-5.
- Langberg JM, Becker SP. Does long-term medication use improve the academic outcomes of youth with attention-deficit/hyperactivity disorder? *Clin Child Fam Psychol Rev.* 2012 Sep; **15(3)**: 215-33.
- Lange KW, Reichl S, Lange KM, Tucha L, Tucha O. The history of attention deficit hyperactivity disorder. *Atten Defic Hyperact Disord.* 2010 Dec; **2(4)**: 241-55.

- Langley K, Fowler T, Ford T, Thapar AK, van den Bree M, Harold G, *et al.* Adolescent clinical outcomes for young people with attention-deficit hyperactivity disorder. *Br J Psychiatry*. 2010 Mar; **196(3)**: 235-40.
- Langley K, Rice F, van den Bree MB, Thapar A. Maternal smoking during pregnancy as an environmental risk factor for attention deficit hyperactivity disorder behaviour. A review. *Minerva Pediatr*. 2005 Dec; **57(6)**: 359-71.
- Lara C, Fayyad J, de Graaf R, Kessler RC, Aguilar-Gaxiola S, Angermeyer M, *et al.* Childhood predictors of adult attention-deficit/hyperactivity disorder: results from the World Health Organization World Mental Health Survey Initiative. *Biol Psychiatry*. 2009 Jan 1; **65(1)**: 46-54.
- Larson K, Russ SA, Kahn RS, Halfon N. Patterns of comorbidity, functioning, and service use for US children with ADHD, 2007. *Pediatrics*. 2011 Mar; **127(3)**: 462-70.
- Larsson H, Anckarsater H, Råstam M, Chang Z, Lichtenstein P. 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*. 2012 Jan; **53(1)**: 73-80.
- Larsson H, Asherson P, Chang Z, Ljung T, Friedrichs B, Larsson JO, *et al.* Genetic and environmental influences on adult attention deficit hyperactivity disorder symptoms: a large Swedish population-based study of twins. *Psychol Med*. 2013 Jan; **43(1)**: 197-207.
- Larsson H, Chang Z, D'Onofrio BM, Lichtenstein P. The heritability of clinically diagnosed attention deficit hyperactivity disorder across the lifespan. *Psychol Med*. 2014a Jul; **44(10)**: 2223-9.
- Larsson H, Sariaslan A, Långström N, D'Onofrio B, Lichtenstein P. Family income in early childhood and subsequent attention deficit/hyperactivity disorder: a quasi-experimental study. *J Child Psychol Psychiatry*. 2014b May; **55(5)**: 428-35.
- Lasky-Su J, Anney RJ, Neale BM, Franke B, Zhou K, Maller JB, *et al.* Genome-wide association scan of the time to onset of attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2008b Dec 5; **147B(8)**: 1355-8.
- Lasky-Su J, Neale BM, Franke B, Anney RJ, Zhou K, Maller JB, *et al.* Genome-wide association scan of quantitative traits for attention deficit hyperactivity disorder identifies novel associations and confirms candidate gene associations. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2008a; **147B(8)**: 1345-54.
- Latchman DS. Gene Regulation: A Eukaryotic Perspective. BIOS Advanced Text. 5th ed. New York: Taylor & Francis Group; 2005.
- Le HH, Hodgkins P, Postma MJ, Kahle J, Sikirica V, Setyawan J, *et al.* Economic impact of childhood/adolescent ADHD in a European setting: the Netherlands as a reference case. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2014 Jul; **23(7)**: 587-98.
- Learned-Coughlin SM, Bergström M, Savitcheva I, Ascher J, Schmith VD, Långström B. In vivo activity of bupropion at the human dopamine transporter as measured by positron emission tomography. *Biol Psychiatry*. 2003 Oct 15; **54(8)**: 800-5.
- Leitner Y. The co-occurrence of autism and attention deficit hyperactivity disorder in children—what do we know? *Front Hum Neurosci*. 2014 Apr 29; **8**: 268.

- Lesch KP, Selch S, Renner TJ, Jacob C, Nguyen TT, Hahn T, *et al.* Genome-wide copy number variation analysis in attention-deficit/hyperactivity disorder: association with neuropeptide Y gene dosage in an extended pedigree. *Mol Psychiatry*. 2011 May; **16(5)**: 491-503.
- Lesch KP, Timmesfeld N, Renner TJ, Halperin R, Rösler C, Nguyen TT *et al.* Molecular genetics of adult ADHD: converging evidence from genome-wide association and extended pedigree linkage studies. *J Neural Transm*. 2008; **115**: 1573–85.
- Levitt P, Eagleson KL, Powell EM. Regulation of neocortical interneuron development and the implications for neurodevelopmental disorders. *Trends Neurosci*. 2004 Jul; **27(7)**: 400-6.
- Levy F. Dopamine vs. noradrenaline: inverted-U effects and ADHD theories. *Aust N Z Psychiatry*. 2009; **43(2)**: 101–8.
- Li D, Sham PC, Owen MJ, He L. Meta-analysis shows significant association between dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Hum Mol Genet*. 2006 Jul 15; **15(14)**: 2276-84.
- Li L, Wu H, Qian J, Li M, Li Y, Li B, *et al.* Decreased Na⁺/K⁺ ATPase α 1 (ATP1A1) gene expression in major depression patients' peripheral blood. *Cent Eur J Biol*. 2013; **8**: 1077–1082.
- Li Q, Lu G, Antonio GE, Mak YT, Rudd JA, Fan M, *et al.* The usefulness of the spontaneously hypertensive rat to model attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) may be explained by the differential expression of dopamine-related genes in the brain. *Neurochem Int*. 2007 May; **50(6)**: 848-57.
- Li Q, Wong JH, Lu G, Antonio GE, Yeung DK, Ng TB, *et al.* Gene expression of synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25) in the prefrontal cortex of the spontaneously hypertensive rat (SHR). *Biochim Biophys Acta*. 2009 Aug; **1792(8)**: 766-76.
- Li S, Wang L, Fu B, Dorf ME. Trim65: a cofactor for regulation of the microRNA pathway. *RNA Biol*. 2014b; **11(9)**: 1113-21.
- Li Y, Li S, Yan J, Wang D, Yin R, Zhao L, *et al.* miR-182 (microRNA-182) suppression in the hippocampus evokes antidepressant-like effects in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016 Feb 4; **65**: 96-103.
- Li Z, Chang SH, Zhang LY, Gao L, Wang J. Molecular genetic studies of ADHD and its candidate genes: a review. *Psychiatry Res*. 2014a Sep 30; **219(1)**: 10-24.
- Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics*. 2007; **8**: 166.
- Liao HM, Fang JS, Chen YJ, Wu KL, Lee KF, Chen CH. Clinical and molecular characterization of a transmitted reciprocal translocation t(1;12)(p32.1;q21.3) in a family co-segregating with mental retardation, language delay, and microcephaly. *BMC Med Genet*. 2011 May 20; **12**: 70.
- Lichtenstein P, Halldner L, Zetterqvist J, Sjölander A, Serlachius E, Fazel S, *et al.* Medication for attention deficit-hyperactivity disorder and criminality. *N Engl J Med*. 2012 Nov 22; **367(21)**: 2006-14.
- Lin AW, Man HY. Ubiquitination of neurotransmitter receptors and postsynaptic scaffolding proteins. *Neural Plast*. 2013; **2013**: 432057.

- Lingineni RK, Biswas S, Ahmad N, Jackson BE, Bae S, Singh KP. Factors associated with attention deficit/hyperactivity disorder among US children: results from a national survey. *BMC Pediatr.* 2012 May 14; **12**: 50.
- Linnet KM, Dalsgaard S, Obel C, Wisborg K, Henriksen TB, Rodriguez A, *et al.* Maternal lifestyle factors in pregnancy risk of attention deficit hyperactivity disorder and associated behaviors: review of the current evidence. *Am J Psychiatry.* 2003 Jun; **160(6)**: 1028-40.
- Lionel AC, Tammimies K, Vaags AK, Rosenfeld JA, Ahn JW, Merico D, *et al.* Disruption of the ASTN2/TRIM32 locus at 9q33.1 is a risk factor in males for autism spectrum disorders, ADHD and other neurodevelopmental phenotypes. *Hum Mol Genet.* 2014 May 15; **23(10)**: 2752-68.
- Liu C, Zhang F, Li T, Lu M, Wang L, Yue W, *et al.* MirSNP, a database of polymorphisms altering miRNA target sites, identifies miRNA-related SNPs in GWAS SNPs and eQTLs. *BMC Genomics.* 2012 Nov 23; **13**: 661.
- Liu C. Brain expression quantitative trait locus mapping informs genetic studies of psychiatric diseases. *Neurosci Bull.* 2011 Apr; **27(2)**: 123-33.
- Liu L, Li Y, Tollesbol TO. Gene-environment interactions and epigenetic basis of human diseases. *Curr Issues Mol Biol.* 2008; **10(1-2)**: 25-36.
- Lo HS, Wang Z, Hu Y, Yang HH, Gere S, Buetow KH, *et al.* Allelic variation in gene expression is common in the human genome. *Genome Res.* 2003 Aug; **13(8)**: 1855-62.
- Loe IM, Feldman HM. Academic and educational outcomes of children with ADHD. *J Pediatr Psychol.* 2007 Jul; **32(6)**: 643-54.
- Lofthouse N, Arnold LE, Hersch S, Hurt E, DeBeus R. A review of neurofeedback treatment for pediatric ADHD. *J Atten Disord.* 2012 Jul; **16(5)**: 351-72.
- Louros SR, Osterweil EK. Perturbed proteostasis in autism spectrum disorders. *J Neurochem.* 2016 Dec; **139(6)**: 1081-1092.
- Lutz M, Wempe F, Bahr I, Zopf D, von Melchner H. Proteasomal degradation of the multifunctional regulator YB-1 is mediated by an F-Box protein induced during programmed cell death. *FEBS Lett.* 2006 Jul 10; **580(16)**: 3921-30.

M

- Ma I, van Holstein M, Mies GW, Mennes M, Buitelaar J, Cools R, *et al.* Ventral striatal hyperconnectivity during rewarded interference control in adolescents with ADHD. *Cortex.* 2016 Sep; **82**: 225-36.
- Ma L, Clark AG, Keinan A. Gene-based testing of interactions in association studies of quantitative traits. *PLoS Genet.* 2013; **9(2)**: e1003321.
- Mackay TF. Epistasis and quantitative traits: using model organisms to study gene-gene interactions. *Nat Rev Genet.* 2014 Jan; **15(1)**: 22-33.

- Maffioletti E, Cattaneo A, Rosso G, Maina G, Maj C, Gennarelli M, *et al.* Peripheral whole blood microRNA alterations in major depression and bipolar disorder. *J Affect Disord.* 2016 Aug; **200**: 250-8.
- Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric GWAS Consortium., Ripke S, Wray NR, Lewis CM, Hamilton SP, Weissman MM, *et al.* A mega-analysis of genome-wide association studies for major depressive disorder. *Mol Psychiatry.* 2013 Apr; **18(4)**: 497-511.
- Makris N, Biederman J, Monuteaux MC, Seidman LJ. Towards conceptualizing a neural systems-based anatomy of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Dev Neurosci.* 2009; **31(1-2)**: 36-49.
- Maldonado G, Greenland S. Simulation study of confounder-selection strategies. *Am J Epidemiol.* 1993 Dec 1; **138(11)**: 923-36.
- Malki K, Du Rietz E, Crusio WE, Pain O, Paya-Cano J, Karadaghi RL, *et al.* Transcriptome analysis of genes and gene networks involved in aggressive behavior in mouse and zebrafish. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2016 Sep; **171(6)**: 827-38.
- Mannuzza S, Klein RG, Bessler A, Malloy P, Hynes ME. Educational and occupational outcome of hyperactive boys grown up. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 1997 Sep; **36(9)**: 1222-7.
- Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorf LA, Hunter DJ, *et al.* Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature.* 2009 Oct 8; **461(7265)**: 747-53.
- Manshadi M, Lippmann S, O'Daniel RG, Blackman A. Alcohol abuse and attention deficit disorder. *J Clin Psychiatry.* 1983; **44**: 379-380.
- Marco R, Miranda A, Schlotz W, Melia A, Mulligan A, Müller U, *et al.* Delay and reward choice in ADHD: an experimental test of the role of delay aversion. *Neuropsychology.* 2009 May; **23(3)**: 367-80.
- Marín-Méndez JJ, Patiño-García A, Segura V, Ortuño F, Gálvez MD, Soutullo CA. Differential expression of prostaglandin D2 synthase (PTGDS) in patients with attention deficit-hyperactivity disorder and bipolar disorder. *J Affect Disord.* 2012 May; **138(3)**: 479-84.
- Marsh AA, Finger EC, Mitchell DG, Reid ME, Sims C, Kosson DS, *et al.* Reduced amygdala response to fearful expressions in children and adolescents with callous-unemotional traits and disruptive behavior disorders. *Am J Psychiatry.* 2008 Jun; **165(6)**: 712-20.
- Martin J, Cooper M, Hamshere ML, Pocklington A, Scherer SW, Kent L, *et al.* Biological overlap of attention-deficit/hyperactivity disorder and autism spectrum disorder: evidence from copy number variants. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2014 Jul; **53(7)**: 761-70.e26.
- Martinez-Badía J, Martinez-Raga J. Who says this is a modern disorder? The early history of attention deficit hyperactivity disorder. *World J Psychiatry.* 2015 Dec 22; **5(4)**: 379-86.
- Mastronardi CA, Pillai E, Pineda DA, Martinez AF, Lopera F, Velez JI, *et al.* Linkage and association analysis of ADHD endophenotypes in extended and multigenerational pedigrees from a genetic isolate. *Mol Psychiatry.* 2016 Oct; **21(10)**: 1434-40.
- Matsunami N, Hensel CH, Baird L, Stevens J, Otterud B, Leppert T, *et al.* Identification of rare DNA sequence variants in high-risk autism families and their prevalence in a large case/control population. *Mol Autism.* 2014 Jan 27; **5(1)**: 5.

- Matte B, Anselmi L, Salum GA, Kieling C, Gonçalves H, Menezes A, *et al.* ADHD in DSM-5: a field trial in a large, representative sample of 18- to 19-year-old adults. *Psychol Med.* 2015 Jan; **45(2)**: 361-73.
- Matthews M, Nigg JT, Fair DA. Attention deficit hyperactivity disorder. *Curr Top Behav Neurosci.* 2014; **16**: 235-66.
- McAlonan GM, Cheung V, Cheung C, Chua SE, Murphy DG, Suckling J, *et al.* Mapping brain structure in attention deficit-hyperactivity disorder: a voxel-based MRI study of regional grey and white matter volume. *Psychiatry Res.* 2007 Feb 28; **154(2)**: 171-80.
- McCarthy S, Wilton L, Murray ML, Hodgkins P, Asherson P, Wong IC. The epidemiology of pharmacologically treated attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in children, adolescents and adults in UK primary care. *BMC Pediatr.* 2012 Jun 19; **12**: 78.
- McCullumsmith RE, Hammond JH, Shan D, Meador-Woodruff JH. Postmortem brain: an underutilized substrate for studying severe mental illness. *Neuropsychopharmacology.* 2015 Mar 13; **40(5)**: 1307.
- McGough JJ, Barkley RA. Diagnostic controversies in adult attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry.* 2004 Nov; **161(11)**: 1948-56.
- McLoughlin G, Ronald A, Kuntsi J, Asherson P, Plomin R. Genetic support for the dual nature of attention deficit hyperactivity disorder: substantial genetic overlap between the inattentive and hyperactive-impulsive components. *J Abnorm Child Psychol.* 2007 Dec; **35(6)**: 999-1008.
- Metzger MB, Hristova VA, Weissman AM. HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J Cell Sci.* 2012 Feb 1; **125(Pt 3)**: 531-7.
- Michielsen M, Semeijn E, Comijs HC, van de Ven P, Beekman AT, Deeg DJ, *et al.* Prevalence of attention-deficit hyperactivity disorder in older adults in The Netherlands. *Br J Psychiatry.* 2012 Oct; **201(4)**: 298-305.
- Mick E, Biederman J, Faraone SV, Sayer J, Kleinman S. Case-control study of attention-deficit hyperactivity disorder and maternal smoking, alcohol use, and drug use during pregnancy. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2002 Apr; **41(4)**: 378-85.
- Mick E, Todorov A, Smalley S, Hu X, Loo S, Todd RD, *et al.* Family-based genome-wide association scan of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2010 Sep; **49(9)**: 898-905.e3.
- Middeldorp CM, Hammerschlag AR, Ouwens KG, Groen-Blokhuis MM, St Pourcain B, Greven CU, *et al.* A Genome-Wide Association Meta-Analysis of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Symptoms in Population-Based Pediatric Cohorts. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2016 Oct; **55(10)**: 896-905.e6.
- Millar JK, Mackie S, Clapcote SJ, Murdoch H, Pickard BS, Christie S. Disrupted in schizophrenia 1 and phosphodiesterase 4B: towards an understanding of psychiatric illness. *J Physiol.* 2007 Oct 15; **584(Pt 2)**: 401-5.
- Miller BH, Wahlestedt C. MicroRNA dysregulation in psychiatric disease. *Brain Res.* 2010 Jun 18; **1338**: 89-99.

- Mills KL, Bathula D, Dias TG, Iyer SP, Fenesy MC, Musser ED, *et al.* Altered cortico-striatal-thalamic connectivity in relation to spatial working memory capacity in children with ADHD. *Front Psychiatry*. 2012 Jan 25; **3**: 2.
- Miñones-Moyano E, Porta S, Escaramis G, Rabionet R, Iraola S, Kagerbauer B, *et al.* MicroRNA profiling of Parkinson's disease brains identifies early downregulation of miR-34b/c which modulate mitochondrial function. *Hum Mol Genet* 2011; **20**: 3067–3078.
- Minzenberg MJ, Carter CS. Modafinil: a review of neurochemical actions and effects on cognition. *Neuropsychopharmacology*. 2008 Jun; **33(7)**: 1477-502.
- Mogavero F, Jager A, Glennon JC. Clock genes, ADHD and aggression. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016 Nov 9. pii: S0149-7634(16)30448-1. [En premsa]
- Mohammadi MR, Akhondzadeh S. Pharmacotherapy of attention-deficit/hyperactivity disorder: nonstimulant medication approaches. *Expert Rev Neurother* 2007; **7**: 195–201
- Mongia M, Hechtman L. Cognitive behavior therapy for adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: a review of recent randomized controlled trials. *Curr Psychiatry Rep*. 2012 Oct; **14(5)**: 561-7.
- Moskvina V, Craddock N, Holmans P, Nikolov I, Pahwa JS, Green E, *et al.* Gene-wide analyses of genome-wide association data sets: evidence for multiple common risk alleles for schizophrenia and bipolar disorder and for overlap in genetic risk. *Mol Psychiatry*. 2009 Mar; **14(3)**: 252-60.
- MTA Cooperative Group. Multimodal Treatment Study of Children with ADHD. A 14-month randomized clinical trial of treatment strategies for attention-deficit/hyperactivity disorder. The MTA Cooperative Group. Multimodal Treatment Study of Children with ADHD. *Arch Gen Psychiatry*. 1999 Dec; **56(12)**: 1073-86.
- Mulligan A, Anney RJ, O'Regan M, Chen W, Butler L, Fitzgerald M, *et al.* Autism symptoms in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: a familial trait which correlates with conduct, oppositional defiant, language and motor disorders. *J Autism Dev Disord*. 2009 Feb; **39(2)**: 197-209.
- Munkholm K, Pejls L, Vinberg M, Kessing LV. A composite peripheral blood gene expression measure as a potential diagnostic biomarker in bipolar disorder. *Transl Psychiatry*. 2015 Aug 4; **5**: e614.
- Myers AJ, Gibbs JR, Webster JA, Rohrer K, Zhao A, *et al.* Marlowe L A survey of genetic human cortical gene expression. *Nat Genet*. 2007 Dec; **39(12)**: 1494-9.

N

- Naaijen J, Bralten J, Poelmans G; IMAGE consortium., Glennon JC, Franke B, *et al.* Glutamatergic and GABAergic gene sets in attention-deficit/hyperactivity disorder: association to overlapping traits in ADHD and autism. *Transl Psychiatry*. 2017 Jan 10; **7(1)**: e999.
- Najmabadi H, Hu H, Garshasbi M, Zemojtel T, Abedini SS, Chen W, *et al.* Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature*. 2011 Sep 21; **478(7367)**: 57-63.

- Nakao T, Radua J, Rubia K, Mataix-Cols D. Gray matter volume abnormalities in ADHD: voxel-based meta-analysis exploring the effects of age and stimulant medication. *Am J Psychiatry*. 2011 Nov; **168(11)**: 1154-63.
- Nazeen S, Palmer NP, Berger B, Kohane IS. Integrative analysis of genetic data sets reveals a shared innate immune component in autism spectrum disorder and its co-morbidities. *Genome Biol*. 2016 Nov 14; **17(1)**: 228.
- Neale BM, Lasky-Su J, Anney R, Franke B, Zhou K, Maller JB *et al*. Genome-wide association scan of attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2008; **147B**: 1337-44.
- Neale BM, Medland S, Ripke S, Anney RJ, Asherson P, Buitelaar J, *et al*. IMAGE II Consortium Group. Case-control genome-wide association study of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2010a Sep; **49(9)**: 906-20.
- Neale BM, Medland SE, Ripke S, Asherson P, Franke B, Lesch KP, *et al*. Psychiatric GWAS Consortium: ADHD Subgroup. Meta-analysis of genome-wide association studies of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2010b Sep; **49(9)**: 884-97.
- Nebel RA, Kirschen J, Cai J, Woo YJ, Cherian K, Abrahams BS. Reciprocal Relationship between Head Size, an Autism Endophenotype, and Gene Dosage at 19p13.12 Points to AKAP8 and AKAP8L. *PLoS One*. 2015 Jun 15; **10(6)**: e0129270.
- Németh N, Kovács-Nagy R, Székely A, Sasvári-Székely M, Rónai Z. Association of impulsivity and polymorphic microRNA-641 target sites in the SNAP-25 gene. *PLoS One*. 2013 Dec 31; **8(12)**: e84207.
- Neumann H. Lehrbuch der Psychiatrie. Erlangen: Enke Verlag; 1859.
- Nigg JT, Holton K. Restriction and elimination diets in ADHD treatment. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*. 2014 Oct; **23(4)**: 937-53.
- Nikolaidis A, Gray JR. ADHD and the DRD4 exon III 7-repeat polymorphism: an international meta-analysis. *Soc Cogn Affect Neurosci*. 2010 Jun; **5(2-3)**: 188-93.
- Numata S, Iga J, Nakataki M, Tayoshi S, Taniguchi K, Sumitani S, *et al*. Gene expression and association analyses of the phosphodiesterase 4B (PDE4B) gene in major depressive disorder in the Japanese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2009 Jun 5; **150B(4)**: 527-34.
- Nussbaum NL. ADHD and female specific concerns: a review of the literature and clinical implications. *J Atten Disord*. 2012 Feb; **16(2)**: 87-100. PMID: 21976033
- Nutt DJ, Fone K, Asherson P, Bramble D, Hill P, Matthews K, *et al*; British Association for Psychopharmacology. Evidence-based guidelines for management of attention-deficit/hyperactivity disorder in adolescents in transition to adult services and in adults: recommendations from the British Association for Psychopharmacology. *J Psychopharmacol*. 2007 Jan; **21(1)**: 10-41.

O

- Oades RD. Dopamine may be 'hyper' with respect to noradrenaline metabolism, but 'hypo' with respect to serotonin metabolism in children with attention-deficit hyperactivity disorder. *Behav Brain Res.* 2002 Mar 10; **130(1-2)**: 97-102.
- Oades RD. Dopamine-serotonin interactions in attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Prog Brain Res.* 2008; **172**: 543–565.
- O'Carroll D, Schaefer A. General principals of miRNA biogenesis and regulation in the brain. *Neuropsychopharmacology.* 2013 Jan; **38(1)**: 39-54.
- Ogdie MN, Bakker SC, Fisher SE, Francks C, Yang MH, Cantor RM, *et al.* Pooled genome-wide linkage data on 424 ADHD ASPs suggests genetic heterogeneity and a common risk locus at 5p13. *Mol Psychiatry.* 2006 Jan; **11(1)**: 5-8.
- Ogdie MN, Fisher SE, Yang M, Ishii J, Francks C, Loo SK, *et al.* Attention deficit hyperactivity disorder: fine mapping supports linkage to 5p13, 6q12, 16p13, and 17p11. *Am J Hum Genet.* 2004 Oct; **75(4)**: 661-8.
- Ogdie MN, Macphie IL, Minassian SL, Yang M, Fisher SE, Francks C, *et al.* A genomewide scan for attention-deficit/hyperactivity disorder in an extended sample: suggestive linkage on 17p11. *Am J Hum Genet.* 2003 May; **72(5)**: 1268-79.
- O'Roak BJ, Vives L, Girirajan S, Karakoc E, Krumm N, Coe BP, *et al.* Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature.* 2012 Apr 4; **485(7397)**: 246-50.
- Otowa T, Kawamura Y, Nishida N, Sugaya N, Koike A, Yoshida E, *et al.* Meta-analysis of genome-wide association studies for panic disorder in the Japanese population. *Transl Psychiatry.* 2012 Nov 13; **2**: e186.
- Overmeyer S, Bullmore ET, Suckling J, Simmons A, Williams SC, Santosh PJ, *et al.* Distributed grey and white matter deficits in hyperkinetic disorder: MRI evidence for anatomical abnormality in an attentional network. *Psychol Med.* 2001 Nov; **31(8)**: 1425-35.

P

- Chou PY, Fasman GD. Prediction of protein conformation. *Biochemistry.* 1974 Jan; **13(2)**: 222-45.
- Pandya CD, Crider A, Pillai A. Glucocorticoid regulates parkin expression in mouse frontal cortex: implications in schizophrenia. *Curr Neuropharmacol.* 2014; **12**: 100-7.
- Park S, Lee JM, Kim JW, Cho DY, Yun HJ, Han DH, *et al.* Associations between serotonin transporter gene (SLC6A4) methylation and clinical characteristics and cortical thickness in children with ADHD. *Psychol Med.* 2015 Oct; **45(14)**: 3009-17.
- Pasquinelli AE. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet.* 2012 Mar 13; **13(4)**: 271-82.

- Peng Z, Shi T, Ma D. RNF122: a novel ubiquitin ligase associated with calcium-modulating cyclophilin ligand. *BMC Cell Biol.* 2010 Jun 17; **11**: 41.
- Persengiev S, Kondova I, Bontrop RE. Functional annotation of small noncoding mas target genes provides evidence for a deregulated ubiquitin-proteasome pathway in spinocerebellar ataxia type 1. *J Nucleic Acids.* 2012; **2012**: 672536.
- Pettersson FH, Anderson CA, Clarke GM, Barrett JC, Cardon LR, Morris AP, *et al.* Marker selection for genetic case-control association studies. *Nat Protoc.* 2009; **4(5)**: 743-52
- Pfiffner LJ, Haack LM. Behavior management for school-aged children with ADHD. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am.* 2014 Oct; **23(4)**: 731-46.
- Pietrzykowski AZ, Spijker S. Impulsivity and comorbid traits: a multi-step approach for finding putative responsible microRNAs in the amygdala. *Front Neurosci.* 2014 Dec 11; **8**: 389.
- Plichta MM, Scheres A Ventral-striatal responsiveness during reward anticipation in ADHD and its relation to trait impulsivity in the healthy population: a meta-analytic review of the fMRI literature. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014 Jan; **38**: 125-34.
- Poelmans G, Franke B, Pauls DL, Glennon JC, Buitelaar JK. AKAPs integrate genetic findings for autism spectrum disorders. *Transl Psychiatry.* 2013 Jun 11; **3**: e270.
- Poelmans G, Pauls DL, Buitelaar JK, Franke B. Integrated genome-wide association study findings: identification of a neurodevelopmental network for attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry.* 2011; **168**: 365-77.
- Polanczyk G, Caspi A, Houts R, Kollins SH, Rohde LA, Moffitt TE. Implications of extending the ADHD age-of-onset criterion to age 12: results from a prospectively studied birth cohort. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2010 Mar; **49(3)**: 210-6.
- Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, Biederman J, Rohde LA. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry.* 2007 Jun; **164(6)**: 942-8.
- 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 Mar; **56(3)**: 345-65.
- Polanczyk GV, Willcutt EG, Salum GA, Kieling C, Rohde LA. ADHD prevalence estimates across three decades: an updated systematic review and meta-regression analysis. *Int J Epidemiol.* 2014 Apr; **43(2)**: 434-42.
- Pompanon F, Bonin A, Belleman E, Taberlet P. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nat Rev Genet.* 2005 Nov; **6(11)**: 847-59.
- Posner J, Park C, Wang Z. Connecting the dots: a review of resting connectivity MRI studies in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychol Rev.* 2014 Mar; **24(1)**: 3-15.
- Psychosis Endophenotypes International Consortium; A genome-wide association analysis of a broad psychosis phenotype identifies three loci for further investigation. *Biol Psychiatry.* 2014 Mar 1; **75(5)**: 386-97.

Purper-Ouakil D, Wohl M, Mouren MC, Verpillat P, Adès J, Gorwood P. Meta-analysis of family-based association studies between the dopamine transporter gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr Genet*. 2005 Mar; **15(1)**: 53-9.

Q

Qiu J, Hong Q, Chen RH, Tong ML, Zhang M, Fei L, *et al*. Gene expression profiles in the prefrontal cortex of SHR rats by cDNA microarrays. *Mol Biol Rep*. 2010 Apr; **37(4)**: 1733-40.

Quintela I, Gomez-Guerrero L, Fernandez-Prieto M, Resches M, Barros F, Carracedo A. Female patient with autistic disorder, intellectual disability, and co-morbid anxiety disorder: Expanding the phenotype associated with the recurrent 3q13.2-q13.31 microdeletion. *Am J Med Genet A*. 2015 Dec; **167A(12)**: 3121-9.

Quitkin F, Klein DF. Two behavioral syndromes in young adults related to possible minimal brain dysfunction. *J Psychiatr Res*. 1969 Dec; **7(2)**: 131-42.

R

Raber J, Mehta PP, Kreifeldt M, Parsons LH, Weiss F, Bloom FE, *et al*. Coloboma hyperactive mutant mice exhibit regional and transmitter-specific deficits in neurotransmission. *J Neurochem*. 1997 Jan; **68(1)**: 176-86.

Ramos-Quiroga JA, Bosch-Munsó R, Castells-Cervelló X, Nogueira-Morais M, García-Gimenez E, Casas-Brugué M. Attention deficit hyperactivity disorder in adults: a clinical and therapeutic characterization. *Rev Neurol*. 2006 May 16-31; **42(10)**: 600-6.

Ramos-Quiroga JA, Chalita PJ, Vidal R, Bosch R, Palomar G, Prats L, *et al*. Diagnosis and treatment of attention deficit hyperactivity disorder in adults. *Rev Neurol*. 2012 Feb 29; **54 Suppl 1**: S105-15.

Ramos-Quiroga JA, Sánchez-Mora C, Casas M, Garcia-Martínez I, Bosch R, Nogueira M, *et al*. Genome-wide copy number variation analysis in adult attention-deficit and hyperactivity disorder. *J Psychiatr Res*. 2014 Feb; **49**: 60-7.

Rappley MD. Clinical practice. Attention deficit-hyperactivity disorder. *N Engl J Med*. 2005 Jan 13; **352(2)**: 165-73.

Reiersen AM, Constantino JN, Volk HE, Todd RD. Autistic traits in a population-based ADHD twin sample. *J Child Psychol Psychiatry*. 2007 May; **48(5)**: 464-72.

Ribasés M, Bosch R, Hervás A, Ramos-Quiroga JA, Sánchez-Mora C, Bielsa A, *et al*. Case-control study of six genes asymmetrically expressed in the two cerebral hemispheres: association of BAIAP2 with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*. 2009b Nov 15; **66(10)**: 926-34

- Ribasés M, Hervás A, Ramos-Quiroga JA, Bosch R, Bielsa A, Gastaminza X, *et al.* Association study of 10 genes encoding neurotrophic factors and their receptors in adult and child attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*. 2008 May 15; **63(10)**: 935-45.
- Ribasés M, Ramos-Quiroga JA, Hervás A, Bosch R, Bielsa A, Gastaminza X, *et al.* Exploration of 19 serotonergic candidate genes in adults and children with attention-deficit/hyperactivity disorder identifies association for 5HT2A, DDC and MAOB. *Mol Psychiatry*. 2009a Jan; **14(1)**: 71-85.
- Ribasés M, Ramos-Quiroga JA, Hervás A, Sánchez-Mora C, Bosch R, Bielsa A, *et al.* Candidate system analysis in ADHD: evaluation of nine genes involved in dopaminergic neurotransmission identifies association with DRD1. *World J Biol Psychiatry*. 2012 Apr; **13(4)**: 281-92.
- 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 Mar; **10(2)**: 149-57.
- Richards AL, Jones L, Moskvina V, Kirov G, Gejman PV, Levinson DF, *et al.*; Molecular Genetics of Schizophrenia Collaboration (MGS); International Schizophrenia Consortium (ISC). Schizophrenia susceptibility alleles are enriched for alleles that affect gene expression in adult human brain. *Mol Psychiatry*. 2012 Feb; **17(2)**: 193-201.
- Ripke S, O'Dushlaine C, Chambert K, Moran JL, Kähler AK, Akterin S, *et al.* Genome-wide association analysis identifies 13 new risk loci for schizophrenia. *Nature Genetics*. 2013 Aug; **45**, 1150-59.
- Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, *et al.* Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015 Apr 20; **43(7)**: e47.
- Rizos E, Siafakas N, Katsantoni E, Skourti E, Salpeas V, Rizos I, *et al.* Let-7, mir-98 and mir-183 as biomarkers for cancer and schizophrenia [corrected]. *PLoS One*. 2015 Apr 9; **10(4)**: e0123522.
- Rizos E, Siafakas N, Koumariou A, Katsantoni E, Filippopoulou A, Ntounas P, *et al.* miR-183 as a molecular and protective biomarker for cancer in schizophrenic subjects. *Oncol Rep*. 2012 Dec; **28(6)**: 2200-4.
- Rommelse NN, Arias-Vásquez A, Altink ME, Buschgens CJ, Fliers E, Asherson P, *et al.* Neuropsychological endophenotype approach to genome-wide linkage analysis identifies susceptibility loci for ADHD on 2q21.1 and 13q12.11. *Am J Hum Genet*. 2008 Jul; **83(1)**: 99-105.
- Ronis SD, Baldwin CD, Blumkin A, Kuhlthau K, Szilagyi PG. Patient-Centered Medical Home and Family Burden in Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. *J Dev Behav Pediatr*. 2015 Jul-Aug; **36(6)**: 417-25
- Rostain A, Jensen PS, Connor DF, Miesle LM, Faraone SV. Toward quality care in ADHD: defining the goals of treatment. *J Atten Disord*. 2015 Feb; **19(2)**: 99-117.
- Rothenberger A, Neumärker KJ. Wissenschaftsgeschichte der ADHS: Kramer-Pollnow im Spiegel der Zeit. Darmstadt: Steinkopff; 2005.
- Rubia K, Cubillo A, Smith AB, Woolley J, Heyman I, Brammer MJ. Disorder-specific dysfunction in right inferior prefrontal cortex during two inhibition tasks in boys with attention-deficit hyperactivity disorder compared to boys with obsessive-compulsive disorder. *Hum Brain Mapp*. 2010 Feb; **31(2)**: 287-99.

- Rubia K, Halari R, Christakou A, Taylor E. Impulsiveness as a timing disturbance: neurocognitive abnormalities in attention-deficit hyperactivity disorder during temporal processes and normalization with methylphenidate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2009 Jul 12; **364(1525)**: 1919-31.
- Rubia K. "Cool" inferior frontostriatal dysfunction in attention-deficit/hyperactivity disorder versus "hot" ventromedial orbitofrontal-limbic dysfunction in conduct disorder: a review. *Biol Psychiatry.* 2011 Jun 15; **69(12)**: e69-87.
- Rubio MD, Wood K, Haroutunian V, Meador-Woodruff JH. Dysfunction of the ubiquitin proteasome and ubiquitin-like systems in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* 2013 Sep; **38(10)**: 1910-20.
- Rush B. Medical inquiries and observations upon the diseases of the mind. Philadelphia: Kimber and Richardson; 1812.
- Russell VA. Reprint of "Neurobiology of animal models of attention-deficit hyperactivity disorder". *J Neurosci Methods.* 2007 Nov 30; **166(2)**: I-XIV.
- Rutter M, Kreppner J, Croft C, Murin M, Colvert E, Beckett C, *et al.* Early adolescent outcomes of institutionally deprived and non-deprived adoptees. III. Quasi-autism. *J Child Psychol Psychiatry.* 2007 Dec; **48(12)**: 1200-7.
- Ryan MM, Lockstone HE, Huffaker SJ, Wayland MT, Webster MJ, Bahn S. Gene expression analysis of bipolar disorder reveals downregulation of the ubiquitin cycle and alterations in synaptic genes. *Mol Psychiatry.* 2006 Oct; **11(10)**: 965-78.
- Rybak A, Fuchs H, Hadian K, Smirnova L, Wulczyn EA, Michel G, *et al.* The let-7 target gene mouse lin-41 is a stem cell specific E3 ubiquitin ligase for the miRNA pathway protein Ago2. *Nat Cell Biol.* 2009 Dec; **11(12)**: 1411-20.

S

- Saba R, Goodman CD, Huzarewich RL, Robertson C, Booth SA. A miRNA signature of prion induced neurodegeneration. *PLoS One.* 2008; **3(11)**: e3652.
- Safren SA, Duran P, Yovel I, Perlman CA, Sprich S. Medication adherence in psychopharmacologically treated adults with ADHD. *J Atten Disord.* 2007 Feb; **10(3)**: 257-60.
- Safren SA. Cognitive-behavioral approaches to ADHD treatment in adulthood. *J Clin Psychiatry.* 2006; **67 Suppl 8**: 46-50.
- Sagvolden T, Johansen EB. Rat models of ADHD. *Curr Top Behav Neurosci.* 2012; **9**: 301-15.
- Saia-Cereda VM, Cassoli JS, Schmitt A, Falkai P, Nascimento JM, Martins-de-Souza D. Proteomics of the corpus callosum unravel pivotal players in the dysfunction of cell signaling, structure, and myelination in schizophrenia brains. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2015 Oct; **265(7)**: 601-12.
- Saito K, Murai J, Kajihō H, Kontani K, Kurosu H, Katada T. A novel binding protein composed of homophilic tetramer exhibits unique properties for the small GTPase Rab5. *J Biol Chem.* 2002 Feb 1; **277(5)**: 3412-8.

- Salas A, Carracedo A. Studies of association in complex diseases: statistical problems related to the analysis of genetic polymorphisms. *Rev Clin Esp*. 2007 Dec; **207(11)**: 563-5.
- Sánchez-Mora C, Cormand B, Ramos-Quiroga JA, Hervás A, Bosch R, Palomar G, *et al*. Evaluation of common variants in 16 genes involved in the regulation of neurotransmitter release in ADHD. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2013 Jun; **23(6)**: 426-35.
- Sánchez-Mora C, Ramos-Quiroga JA, Bosch R, Corrales M, Garcia-Martínez I, Nogueira M, *et al*. Case-control genome-wide association study of persistent attention-deficit hyperactivity disorder identifies FBXO33 as a novel susceptibility gene for the disorder. *Neuropsychopharmacology*. 2015 Mar; **40(4)**: 915-26.
- Sánchez-Mora C, Ribasés M, Ramos-Quiroga JA, Casas M, Bosch R, Boreatti-Hümmer A, *et al*. Meta-analysis of brain-derived neurotrophic factor p.Val66Met in adult ADHD in four European populations. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2010 Mar 5; **153B(2)**: 512-23.
- Sannino G, Pasqualini L, Ricciardelli E, Montilla P, Soverchia L, Ruggeri B, *et al*. Acute stress enhances the expression of neuroprotection- and neurogenesis-associated genes in the hippocampus of a mouse restraint model. *Oncotarget*. 2016 Feb 23; **7(8)**: 8455-65.
- Santoro ML, Santos CM, Ota VK, Gadelha A, Stilhano RS, Diana MC, *et al*. Expression profile of neurotransmitter receptor and regulatory genes in the prefrontal cortex of spontaneously hypertensive rats: relevance to neuropsychiatric disorders. *Psychiatry Res*. 2014 Nov 30; **219(3)**: 674-9.
- Sarter M, Paolone G. Deficits in attentional control: cholinergic mechanisms and circuitry-based treatment approaches. *Behav Neurosci*. 2011; **125 (6)**: 825–835.
- Saudou F, Amara DA, Dierich A, LeMeur M, Ramboz S, Segu L, *et al*. Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT1B receptor. *Science*. 1994 Sep 23; **265(5180)**: 1875-8.
- Saus E, Soria V, Escaramís G, Vivarelli F, Crespo JM, Kagerbauer B, *et al*. Genetic variants and abnormal processing of pre-miR-182, a circadian clock modulator, in major depression patients with late insomnia. *Hum Mol Genet*. 2010 Oct 15; **19(20)**: 4017-25.
- Sayal K, Ford T, Goodman R. Trends in recognition of and service use for attention-deficit hyperactivity disorder in Britain, 1999-2004. *Psychiatr Serv*. 2010 Aug; **61(8)**: 803-10.
- Sazonova NA, DasBanerjee T, Middleton FA, Gowtham S, Schuckers S, Faraone SV. Transcriptome-wide gene expression in a rat model of attention deficit hyperactivity disorder symptoms: rats developmentally exposed to polychlorinated biphenyls. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2011 Dec; **156B(8)**: 898-912.
- Scassellati C, Bonvicini C, Faraone SV, Gennarelli M. Biomarkers and attention-deficit/hyperactivity disorder: a systematic review and meta-analyses. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2012 Oct; **51(10)**: 1003-1019.e20.
- Scheres A, Milham MP, Knutson B, Castellanos FX. Ventral striatal hyporesponsiveness during reward anticipation in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*. 2007 Mar 1; **61(5)**: 720-4.

- Schmidt M, Finley D. Regulation of proteasome activity in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jan; **1843(1)**: 13-25.
- Schuch V, Utsumi DA, Costa TV, Kulikowski LD, Muszkat M. Attention Deficit Hyperactivity Disorder in the Light of the Epigenetic Paradigm. *Front Psychiatry*. 2015 Sep 17; **6**: 126.
- Schuebel K, Gitik M, Domschke K, Goldman D. Making Sense of Epigenetics. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2016 Dec 3; **19(11)**. pii: pyw058.
- Scott MR, Rubio MD, Haroutunian V, Meador-Woodruff JH. Protein Expression of Proteasome Subunits in Elderly Patients with Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 2016 Feb; **41(3)**: 896-905.
- Segurado R, Bellgrove MA, Manconi F, Gill M, Hawi Z. Epistasis between neurochemical gene polymorphisms and risk for ADHD. *Eur J Hum Genet*. 2011 May; **19(5)**: 577-82.
- Sellers R, Maughan B, Pickles A, Thapar A, Collishaw S. Trends in parent- and teacher-rated emotional, conduct and ADHD problems and their impact in prepubertal children in Great Britain: 1999-2008. *J Child Psychol Psychiatry*. 2015 Jan; **56(1)**: 49-57.
- Sesele K, Thanopoulou K, Paouri E, Tsefou E, Klinakis A, Georgopoulos S. Conditional inactivation of nicastrin restricts amyloid deposition in an Alzheimer's disease mouse model. *Aging Cell*. 2013 Dec; **12(6)**: 1032-40.
- Sham PC, Purcell SM. Statistical power and significance testing in large-scale genetic studies. *Nat Rev Genet*. 2014 May; **15(5)**: 335-46.
- Sharp SI, McQuillin A, Gurling HM. Genetics of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Neuropharmacology*. 2009 Dec; **57(7-8)**: 590-600.
- Shaw M, Hodgkins P, Caci H, Young S, Kahle J, Woods AG, *et al*. A systematic review and analysis of long-term outcomes in attention deficit hyperactivity disorder: effects of treatment and non-treatment. *BMC Med*. 2012b Sep 4; **10**: 99.
- Shaw P, De Rossi P, Watson B, Wharton A, Greenstein D, Raznahan A, *et al*. Mapping the development of the basal ganglia in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2014 Jul; **53(7)**: 780-9.e11.
- Shaw P, Eckstrand K, Sharp W, Blumenthal J, Lerch JP, Greenstein D, *et al*. Attention-deficit/hyperactivity disorder is characterized by a delay in cortical maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Dec 4; **104(49)**: 19649-54.
- Shaw P, Gilliam M, Liverpool M, Weddle C, Malek M, Sharp W, *et al*. Cortical development in typically developing children with symptoms of hyperactivity and impulsivity: support for a dimensional view of attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry*. 2011 Feb; **168(2)**: 143-51.
- Shaw P, Lerch J, Greenstein D, Sharp W, Clasen L, Evans A, *et al*. Longitudinal mapping of cortical thickness and clinical outcome in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 2006 May; **63(5)**: 540-9.
- Shaw P, Malek M, Watson B, Sharp W, Evans A, Greenstein D. Development of cortical surface area and gyrification in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*. 2012a Aug 1; **72(3)**: 191-7.

- Shi L, Zhang X, Golhar R, Otieno FG, He M, Hou C, *et al.* Whole-genome sequencing in an autism multiplex family. *Mol Autism*. 2013 Apr 18; **4(1)**: 8.
- Shytle RD, Silver AA, Wilkinson BJ, Sanberg PR. A pilot controlled trial of transdermal nicotine in the treatment of attention deficit hyperactivity disorder. *World J Biol Psychiatry*. 2002 Jul; **3(3)**: 150-5.
- 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 Mar; **194(3)**: 204-11
- Singh A, Yeh CJ, Verma N, Das AK. Overview of Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Young Children. *Health Psychol Res*. 2015 Apr 13; **3(2)**: 2115.
- Singh MK, DelBello MP, Kowatch RA, Strakowski SM. Co-occurrence of bipolar and attention-deficit hyperactivity disorders in children. *Bipolar Disord*. 2006 Dec; **8(6)**: 710-20.
- Siomi H, Siomi MC. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Mol Cell*. 2010 May 14; **38(3)**: 323-32.
- Skounti M, Philalithis A, Galanakis E. Variations in prevalence of attention deficit hyperactivity disorder worldwide. *Eur J Pediatr*. 2007 Feb; **166(2)**: 117-23.
- Slatkin M. Linkage disequilibrium—understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nat Rev Genet*. 2008 Jun; **9(6)**: 477-85.
- Smalley SL, Kustanovich V, Minassian SL, Stone JL, Ogdie MN, McGough JJ, *et al.* Genetic linkage of attention-deficit/hyperactivity disorder on chromosome 16p13, in a region implicated in autism. *Am J Hum Genet*. 2002 Oct; **71(4)**: 959-63.
- Smith AB, Taylor E, Brammer M, Halari R, Rubia K. Reduced activation in right lateral prefrontal cortex and anterior cingulate gyrus in medication-naïve adolescents with attention deficit hyperactivity disorder during time discrimination. *J Child Psychol Psychiatry*. 2008 Sep; **49(9)**: 977-85.
- Smith EN, Bloss CS, Badner JA, Barrett T, Belmonte PL, Berrettini W, *et al.* Genome-wide association study of bipolar disorder in European American and African American individuals. *Mol Psychiatry*. 2009 Aug; **14(8)**: 755-63.
- Smith KM, Bauer L, Fischer M, Barkley R, Navia BA. Identification and characterization of human NR4A2 polymorphisms in attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2005 Feb 5; **133B(1)**: 57-63.
- Smith M, Woodroffe A, Smith R, Holguin S, Martinez J, Filipek PA, *et al.* Molecular genetic delineation of a deletion of chromosome 13q12-->q13 in a patient with autism and auditory processing deficits. *Cytogenet Genome Res*. 2002; **98(4)**: 233-9.
- Smith PJ, Zhang C, Wang J, Chew SL, Zhang MQ, Krainer AR. An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. *Hum Mol Genet*. 2006 Aug 15; **15(16)**: 2490-508.
- Smith TF. Meta-analysis of the heterogeneity in association of DRD4 7-repeat allele and AD/HD: stronger association with AD/HD combined type. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2010 Sep; **153B(6)**: 1189-99.

- Smrt RD, Szulwach KE, Pfeiffer RL, Li X, Guo W, Pathania M, *et al.* MicroRNA miR-137 regulates neuronal maturation by targeting ubiquitin ligase mind bomb-1. *Stem Cells*. 2010 Jun; **28(6)**: 1060-70.
- Sobanski E, Brüggemann D, Alm B, Kern S, Deschner M, Schubert T, *et al.* Psychiatric comorbidity and functional impairment in a clinically referred sample of adults with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2007 Oct; **257(7)**: 371-7.
- Sobanski E, Brüggemann D, Alm B, Kern S, Philipsen A, Schmalzried H, *et al.* Subtype differences in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) with regard to ADHD-symptoms, psychiatric comorbidity and psychosocial adjustment. *Eur Psychiatry*. 2008 Mar; **23(2)**: 142-9.
- Sobanski E. Psychiatric comorbidity in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2006 Sep; **256 Suppl 1**: i26-31.
- Solanto MV. Dopamine dysfunction in AD/HD: integrating clinical and basic neuroscience research. *Behav Brain Res*. 2002 Mar 10; **130(1-2)**: 65-71.
- Solanto MV. Neuropsychopharmacological mechanisms of stimulant drug action in attention-deficit hyperactivity disorder: a review and integration. *Behav Brain Res*. 1998; **94**: 127-152.
- Sonuga-Barke E, Bitsakou P, Thompson M. Beyond the dual pathway model: evidence for the dissociation of timing, inhibitory, and delay-related impairments in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2010 Apr; **49(4)**: 345-55.
- Sonuga-Barke E, Brandeis D, Holtmann M, Cortese S. Computer-based cognitive training for ADHD: a review of current evidence. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*. 2014 Oct; **23(4)**: 807-24.
- Sonuga-Barke EJ, Brandeis D, Cortese S, Daley D, Ferrin M, Holtmann M, *et al*; European ADHD Guidelines Group. Nonpharmacological interventions for ADHD: systematic review and meta-analyses of randomized controlled trials of dietary and psychological treatments. *Am J Psychiatry*. 2013 Mar; **170(3)**: 275-89.
- Sonuga-Barke EJ. Causal models of attention-deficit/hyperactivity disorder: from common simple deficits to multiple developmental pathways. *Biol Psychiatry*. 2005 Jun 1; **57(11)**: 1231-8.
- Sonuga-Barke EJ. The dual pathway model of AD/HD: an elaboration of neuro-developmental characteristics. *Neurosci Biobehav Rev*. 2003 Nov; **27(7)**: 593-604.
- Spencer T, Biederman J, Wilens T. Nonstimulant treatment of adult attention-deficit/hyperactivity disorder. *Psychiatr Clin North Am*. 2004 Jun; **27(2)**: 373-83.
- Sprafkin J, Gadow KD, Weiss MD, Schneider J, Nolan EE. Psychiatric comorbidity in ADHD symptom subtypes in clinic and community adults. *J Atten Disord*. 2007 Sep; **11(2)**: 114-24.
- Spruyt K, Gozal D. Sleep disturbances in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Expert Rev Neurother*. 2011 Apr; **11(4)**: 565-77.
- Squassina A, Manchia M, Borg J, Congiu D, Costa M, Georgitsi M, *et al.* Evidence for association of an ACCN1 gene variant with response to lithium treatment in Sardinian patients with bipolar disorder. *Pharmacogenomics*. 2011 Nov; **12(11)**: 1559-69.

- Staller JA, Faraone SV. Targeting the dopamine system in the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Expert Rev Neurother*. 2007 Apr; **7(4)**: 351-62.
- State M, Thapar A. Genetics. In: Thapar A, Pine DS, Leckman JF, Scott S, Snowling MJ, Taylor EA. Rutter's child and adolescent psychiatry. 6th ed. Oxford, United Kingdom: John Wiley and Sons Limited; 2015.
- Stekel D. Microarray Bioinformatics. 1st ed. United Kingdom: Cambridge University Press; 2003
- Stergiakouli E, Hamshere M, Holmans P, Langley K, Zaharieva I; deCODE Genetics; Psychiatric GWAS Consortium, *et al*. Investigating the contribution of common genetic variants to the risk and pathogenesis of ADHD. *Am J Psychiatry*. 2012 Feb; **169(2)**: 186-94.
- Stevenson J, Buitelaar J, Cortese S, Ferrin M, Konofal E, Lecendreux M, *et al*. Research review: the role of diet in the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder—an appraisal of the evidence on efficacy and recommendations on the design of future studies. *J Child Psychol Psychiatry*. 2014 May; **55(5)**: 416-27.
- Stevenson RD, Wolraich ML. Stimulant medication therapy in the treatment of children with attention deficit hyperactivity disorder. *Pediatr Clin North Am*. 1989 Oct; **36(5)**: 1183-97.
- Still GF. Some abnormal psychical conditions in children: the Goulstonian lectures. *Lancet*. 1902; **1**: 1008-12, 1077-82, 1163-8.
- Stone JL, Merriman B, Cantor RM, Geschwind DH, Nelson SF. High density SNP association study of a major autism linkage region on chromosome 17. *Hum Mol Genet*. 2007 Mar 15; **16(6)**: 704-15.
- Storey JD. A direct approach to false discovery rates. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol*. 2002; **64**: 479-498.
- Storey JD. The positive false discovery rate: A Bayesian interpretation and the q-value. *Ann Stat*. 2003; **31**: 2013-2035.
- Stranger BE, Nica AC, Forrest MS, Dimas A, Bird CP, Beazley C, *et al*. Population genomics of human gene expression. *Nat Genet*. 2007; **39(10)**: 1217-24.
- Strauss AA, Lehtinen LE. Psychopathology and education of the brain-injured child. New York: Grune and Stratton; 1947.
- Stray LL, Kristensen Ø, Lomeland M, Skorstad M, Stray T, Tønnessen FE. Motor regulation problems and pain in adults diagnosed with ADHD. *Behav Brain Funct*. 2013 May 3; **9**: 18.
- Strick PL, Dum RP, Fiez JA. Cerebellum and nonmotor function. *Annu Rev Neurosci*. 2009; **32**: 413-34.
- Stringaris A. Irritability in children and adolescents: a challenge for DSM-5. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2011 Feb; **20(2)**: 61-6.
- Sullivan PF, Fan C, Perou CM. Evaluating the comparability of gene expression in blood and brain. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2006; **141B**: 261–268.
- Sun L, Cheng Z, Zhang F, Xu Y. Gene expression profiling in peripheral blood mononuclear cells of early-onset schizophrenia. *Genom Data*. 2015 Jun 9; **5**: 169-70.

- Sun N, Lei L, Wang Y, Yang C, Liu Z, Li X, *et al.* Preliminary comparison of plasma notch-associated microRNA-34b and -34c levels in drug naive, first episode depressed patients and healthy controls. *J Affect Disord.* 2016 Apr; **194**: 109-14.
- Surman CB, Biederman J, Spencer T, Yorks D, Miller CA, Petty CR, *et al.* Deficient emotional self-regulation and adult attention deficit hyperactivity disorder: a family risk analysis. *Am J Psychiatry.* 2011 Jun; **168(6)**: 617-23.
- Suskauer SJ, Simmonds DJ, Fotedar S, Blankner JG, Pekar JJ, Denckla MB, *et al.* Functional magnetic resonance imaging evidence for abnormalities in response selection in attention deficit hyperactivity disorder: differences in activation associated with response inhibition but not habitual motor response. *J Cogn Neurosci.* 2008 Mar; **20(3)**: 478-93.
- Szatkiewicz JP, O'Dushlaine C, Chen G, Chambert K, Moran JL, Neale BM, *et al.* Copy number variation in schizophrenia in Sweden. *Mol Psychiatry.* 2014 Jul; **19(7)**: 762-73.

T

- Tai HC, Schuman EM. Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci.* 2008 Nov; **9(11)**: 826-38.
- Tallaksen CM, Guichart-Gomez E, Verpillat P, Hahn-Barma V, Ruberg M, Fontaine B, *et al.* Subtle cognitive impairment but no dementia in patients with spastin mutations. *Arch Neurol.* 2003 Aug; **60(8)**: 1113-8.
- Taurines R, Grunblatt E, Schecklmann M, Schwenck C, Albantakis L, Reefschlager L, *et al.* Altered mRNA expression of monoaminergic candidate genes in the blood of children with attention deficit hyperactivity disorder and autism spectrum disorder. *World J Biol Psychiatry.* 2011; **12**: 104–8.
- Telford C, Green C, Logan S, Langley K, Thapar A, Ford T. Estimating the costs of ongoing care for adolescents with attention-deficit hyperactivity disorder. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol.* 2013 Feb; **48(2)**: 337-44.
- Thapar A, Cooper M, Jefferies R, Stergiakouli E. What causes attention deficit hyperactivity disorder? *Arch Dis Child.* 2012 Mar; **97(3)**: 260-5.
- Thapar A, Cooper M. Attention deficit hyperactivity disorder. *Lancet.* 2016 Mar 19; **387(10024)**: 1240-50.
- Thapar A, Rice F, Hay D, Boivin J, Langley K, van den Bree M, *et al.* Prenatal smoking might not cause attention-deficit/hyperactivity disorder: evidence from a novel design. *Biol Psychiatry.* 2009 Oct 15; **66(8)**: 722-7.
- Thomas R, Sanders S, Doust J, Beller E, Glasziou P. Prevalence of attention-deficit/hyperactivity disorder: a systematic review and meta-analysis. *Pediatrics.* 2015 Apr; **135(4)**: e994-1001.
- Thome J, Jacobs KA. Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in a 19th century children's book. *Eur Psychiatry.* 2004; **19**: 303-306

- Tian Y, Stamova B, Ander BP, Jickling GC, Gunther JR, Corbett BA, *et al.* Correlations of gene expression with ratings of inattention and hyperactivity/impulsivity in Tourette syndrome: a pilot study. *BMC Med Genomics*. 2012 Oct 30; **5**: 49.
- Tomblin JB, Mueller KL. How Can the Comorbidity with ADHD Aid Understanding of Language and Speech Disorders? *Top Lang Disord*. 2012 Jul; **32(3)**: 198-206.
- Tong JH, Hawi Z, Dark C, Cummins TD, Johnson BP, Newman DP, *et al.* Separating the wheat from the chaff: systematic identification of functionally relevant noncoding variants in ADHD. *Mol Psychiatry*. 2016 Nov; **21(11)**: 1589-1598.
- Toplak ME, Tannock R. Time perception: modality and duration effects in attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *J Abnorm Child Psychol*. 2005 Oct; **33(5)**: 639-54.
- Torgersen T, Gjervan B, Lensing MB, Rasmussen K. Optimal management of ADHD in older adults. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2016 Jan 8; **12**: 79-87.
- Tremmery S, Buitelaar JK, Steyaert J, Molenberghs G, Feron FJ, Kalff AC, *et al.* The use of health care services and psychotropic medication in a community sample of 9-year-old schoolchildren with ADHD. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2007 Aug; **16(5)**: 327-36.
- Treuer T, Gau SS, Méndez L, Montgomery W, Monk JA, Altin M, *et al.* A systematic review of combination therapy with stimulants and atomoxetine for attention-deficit/hyperactivity disorder, including patient characteristics, treatment strategies, effectiveness, and tolerability. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2013 Apr; **23(3)**: 179-93.
- Tylee DS, Kawaguchi DM, Glatt SJ. On the outside, looking in: a review and evaluation of the comparability of blood and brain "-omes". *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2013 Oct; **162B(7)**: 595-603.

U

- Uddin LQ, Kelly AM, Biswal BB, Margulies DS, Shehzad Z, Shaw D, *et al.* Network homogeneity reveals decreased integrity of default-mode network in ADHD. *J Neurosci Methods*. 2008 Mar 30; **169(1)**: 249-54.

V

- Valera EM, Faraone SV, Murray KE, Seidman LJ. Meta-analysis of structural imaging findings in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*. 2007 Jun 15; **61(12)**: 1361-9.
- van de Loo-Neus GH, Rommelse N, Buitelaar JK. To stop or not to stop? How long should medication treatment of attention-deficit hyperactivity disorder be extended? *Eur Neuropsychopharmacol*. 2011 Aug; **21(8)**: 584-99.

- van der Meer D, Hartman CA, Richards J, Bralten JB, Franke B, Oosterlaan J, *et al.* The serotonin transporter gene polymorphism 5-HTTLPR moderates the effects of stress on attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Child Psychol Psychiatry*. 2014 Dec; **55(12)**: 1363-71.
- van Ewijk H, Heslenfeld DJ, Zwiers MP, Buitelaar JK, Oosterlaan J. Diffusion tensor imaging in attention deficit/hyperactivity disorder: a systematic review and meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev*. 2012 Apr; **36(4)**: 1093-106.
- van Hulzen KJ, Scholz CJ, Franke B, Ripke S, Klein M, McQuillin A, *et al.* Genetic Overlap Between Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Bipolar Disorder: Evidence From Genome-wide Association Study Meta-analysis. *Biol Psychiatry*. 2016 Oct 18. pii: S0006-3223(16)32920-1. [En premsa]
- van Mil NH, Steegers-Theunissen RP, Bouwland-Both MI, Verbiest MM, Rijlaarsdam J, Hofman A, *et al.* DNA methylation profiles at birth and child ADHD symptoms. *J Psychiatr Res*. 2014 Feb; **49**: 51-9.
- van Stralen J. Emotional dysregulation in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Atten Defic Hyperact Disord*. 2016 Dec; **8(4)**: 175-187.
- Vegt R, Bertoli-Avella AM, Tulen JH, de Graaf B, Verkerk AJ, Vervoort J, *et al.* Genome-wide linkage analysis in a Dutch multigenerational family with attention deficit hyperactivity disorder. *Eur J Hum Genet*. 2010 Feb; **18(2)**: 206-11.
- Verbeeck W, Tuinier S, Bekkering GE. Antidepressants in the treatment of adult attention-deficit hyperactivity disorder: a systematic review. *Adv Ther*. 2009 Feb; **26(2)**: 170-84.
- Visser SN, Danielson ML, Bitsko RH, Holbrook JR, Kogan MD, Ghandour RM, *et al.* Trends in the parent-report of health care provider-diagnosed and medicated attention-deficit/hyperactivity disorder: United States, 2003-2011. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2014 Jan; **53(1)**: 34-46.e2.
- Vlachos IS, Paraskevopoulou MD, Karagkouni D, Georgakilas G, Vergoulis T, Kanellos I, *et al.* DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jan; **43(Database issue)**: D153-9.
- Vloet TD, Gilsbach S, Neufang S, Fink GR, Herpertz-Dahlmann B, Konrad K. Neural mechanisms of interference control and time discrimination in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2010 Apr; **49(4)**: 356-67.
- Volk HE, Kerin T, Lurmann F, Hertz-Picciotto I, McConnell R, Campbell DB. Autism spectrum disorder: interaction of air pollution with the MET receptor tyrosine kinase gene. *Epidemiology*. 2014 Jan; **25(1)**: 44-7.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang G, Ding Y, Gatley SJ. Mechanism of action of methylphenidate: insights from PET imaging studies. *J Atten Disord*. 2002; **6 Suppl 1**: S31-43.
- Volkow ND, Wang GJ, Newcorn JH, Kollins SH, Wigal TL, Telang F, *et al.* Motivation deficit in ADHD is associated with dysfunction of the dopamine reward pathway. *Mol Psychiatry*. 2011 Nov; **16(11)**: 1147-54.
- von Rhein D, Cools R, Zwiers MP, van der Schaaf M, Franke B, Luman M, *et al.* Increased neural responses to reward in adolescents and young adults with attention-deficit/hyperactivity disorder and their unaffected siblings. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2015 May; **54(5)**: 394-402.

W

- Walton E, Hass J, Liu J, Roffman JL, Bernardoni F, Roessner V, *et al.* Correspondence of DNA Methylation Between Blood and Brain Tissue and Its Application to Schizophrenia Research. *Schizophr Bull.* 2016 Mar; **42(2)**: 406-14.
- Walton E, Pingault JB, Cecil CA, Gaunt TR, Relton CL, Mill J, *et al.* Epigenetic profiling of ADHD symptoms trajectories: a prospective, methylome-wide study. *Mol Psychiatry.* 2017 Feb; **22(2)**: 250-256.
- Wan Y, Liu Y, Wang X, Wu J, Liu K, Zhou J, *et al.* Identification of differential microRNAs in cerebrospinal fluid and serum of patients with major depressive disorder. *PLoS One.* 2015 Mar 12; **10(3)**: e0121975.
- Wang JC, Froud T, Hinrichs AL, Le NX, Bertelsen S, Budde JP, A genome-wide association study of alcohol-dependence symptom counts in extended pedigrees identifies C15orf53. *Mol Psychiatry.* 2013 Nov; **18(11)**: 1218-24.
- Wang K, Zhang H, Ma D, Bucan M, Glessner JT, Abrahams BS. Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. *Nature.* 2009 May 28; **459(7246)**: 528-33.
- Wang LS, Hranilovic D, Wang K, Lindquist IE, Yurcaba L, Petkovic ZB, *et al.* Population-based study of genetic variation in individuals with autism spectrum disorders from Croatia. *BMC Med Genet.* 2010 Sep 21; **11**: 134.
- Warikoo N, Faraone SV. Background, clinical features and treatment of attention deficit hyperactivity disorder in children. *Expert Opin Pharmacother.* 2013 Oct; **14(14)**: 1885-906.
- Watanabe Y, Yoshida M, Yamanishi K, Yamamoto H, Okuzaki D, Nojima H, *et al.* Genetic analysis of genes causing hypertension and stroke in spontaneously hypertensive rats: Gene expression profiles in the kidneys. *Int J Mol Med.* 2015 Sep; **36(3)**: 712-24.
- Weber W, Vander Stoep A, McCarty RL, Weiss NS, Biederman J, McClellan J. Hypericum perforatum (St John's wort) for attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2008 Jun 11; **299(22)**: 2633-41.
- Weikard MA. Der Philosophische Arzt. Reprinted: Nabu Press; 2013.
- Wells KC, Epstein JN, Hinshaw SP, Conners CK, Klaric J, Abikoff HB, *et al.* Parenting and family stress treatment outcomes in attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): an empirical analysis in the MTA study. *J Abnorm Child Psychol.* 2000 Dec; **28(6)**: 543-53.
- West G. Lectures on the Diseases of Infancy and Childhood. London: Longman, Green, Langman and Roberts; 1848.
- Wigal SB. Efficacy and safety limitations of attention-deficit hyperactivity disorder pharmacotherapy in children and adults. *CNS Drugs.* 2009; **23 Suppl 1**: 21-31.
- Wilens TE, Biederman J, Faraone SV, Martelon M, Westerberg D, Spencer TJ. Presenting ADHD symptoms, subtypes, and comorbid disorders in clinically referred adults with ADHD. *J Clin Psychiatry.* 2009 Nov; **70(11)**: 1557-62.

- Wilens TE, Biederman J, Spencer TJ, Frazier J, Prince J, Bostic J, *et al.* Controlled trial of high doses of pemoline for adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychopharmacol.* 1999 Jun; **19(3)**: 257-64.
- Wilens TE, Spencer TJ, Biederman J. A review of the pharmacotherapy of adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Atten Disord.* 2002 Mar; **5(4)**: 189-202.
- Wilens TE, Spencer TJ. The stimulants revisited. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am.* 2000 Jul; **9(3)**: 573-603, viii.
- Wilens TE. ADHD: prevalence, diagnosis, and issues of comorbidity. *CNS Spectr.* 2007 Apr; **12(4 Suppl 6)**: 1-5.
- Wilens TE. Effects of methylphenidate on the catecholaminergic system in attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychopharmacol.* 2008 Jun; **28(3 Suppl 2)**: S46-53.
- Willcutt EG, Doyle AE, Nigg JT, Faraone SV, Pennington BF. Validity of the executive function theory of attention-deficit/hyperactivity disorder: a meta-analytic review. *Biol Psychiatry.* 2005 Jun 1; **57(11)**: 1336-46.
- Willcutt EG, Nigg JT, Pennington BF, Solanto MV, Rohde LA, Tannock R, *et al.* Validity of DSM-IV attention deficit/hyperactivity disorder symptom dimensions and subtypes. *J Abnorm Psychol.* 2012; **121(4)**: 991–1010.
- Williams NM, Franke B, Mick E, Anney RJ, Freitag CM, Gill M, *et al.* Genome-wide analysis of copy number variants in attention deficit hyperactivity disorder: the role of rare variants and duplications at 15q13.3. *Am J Psychiatry.* 2012 Feb; **169(2)**: 195-204.
- Williams NM, Zaharieva I, Martin A, Langley K, Mantripragada K, Fossdal R, *et al.* Rare chromosomal deletions and duplications in attention-deficit hyperactivity disorder: a genome-wide analysis. *Lancet.* 2010 Oct 23; **376(9750)**: 1401-8.
- Williamson D, Johnston C. Gender differences in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: A narrative review. *Clin Psychol Rev.* 2015 Aug; **40**: 15-27.
- Wilmot B, Fry R, Smeester L, Musser ED, Mill J, Nigg JT. Methylomic analysis of salivary DNA in childhood ADHD identifies altered DNA methylation in VIPR2. *J Child Psychol Psychiatry.* 2016 Feb; **57(2)**: 152-60.
- Wingo AP, Ghaemi SN. A systematic review of rates and diagnostic validity of comorbid adult attention-deficit/hyperactivity disorder and bipolar disorder. *J Clin Psychiatry.* 2007; **68(11)**: 1776–84.
- Woelk T, Oldrini B, Maspero E, Confalonieri S, Cavallaro E, Di Fiore PP, *et al.* Molecular mechanisms of coupled monoubiquitination. *Nat Cell Biol.* 2006 Nov; **8(11)**: 1246-54.
- Woldemichael BT, Jawaid A, Kremer EA, Gaur N, Krol J, Marchais A, *et al.* The microRNA cluster miR-183/96/182 contributes to long-term memory in a protein phosphatase 1-dependent manner. *Nat Commun.* 2016 Aug 25; **7**: 12594.
- Wolosin SM, Richardson ME, Hennessey JG, Denckla MB, Mostofsky SH. Abnormal cerebral cortex structure in children with ADHD. *Hum Brain Mapp.* 2009 Jan; **30(1)**: 175-84.

- Woodbury-Smith M, Paterson AD, Thiruvahindrapduram B, Lionel AC, Marshall CR, Merico D, *et al.* Using extended pedigrees to identify novel autism spectrum disorder (ASD) candidate genes. *Hum Genet.* 2015 Feb; **134(2)**: 191-201.
- World Health Organization. The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders: clinical descriptions and diagnostic guidelines. Geneva: World Health Organization; 1992.
- Wu L, Zhao Q, Zhu X, Peng M, Jia C, Wu W, *et al.* A novel function of microRNA let-7d in regulation of galectin-3 expression in attention deficit hyperactivity disorder rat brain. *Brain Pathol.* 2010 Nov; **20(6)**: 1042-54.
- Wu LH, Cheng W, Yu M, He BM, Sun H, Chen Q, *et al.* Nr3C1-Bhlhb2 Axis Dysregulation Is Involved in the Development of Attention Deficit Hyperactivity. *Mol Neurobiol.* 2016 Jan 28. [Epub ahead of print]
- Wu LH, Peng M, Yu M, Zhao QL, Li C, Jin YT, *et al.* Circulating MicroRNA Let-7d in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Neuromolecular Med.* 2015 Jun; **17(2)**: 137-46.
- Wu Y, Pearl SM, Zigmond MJ, Michael AC. Inhibitory glutamatergic regulation of evoked dopamine release in striatum. *Neuroscience.* 2000; **96(1)**: 65-72.
- Wulczyn FG, Cuevas E, Franzoni E, Rybak A. miRNAs Need a Trim: Regulation of miRNA Activity by Trim-NHL Proteins. *Adv Exp Med Biol.* 2011; **700**: 85-105.

X

- Xu S, Witmer PD, Lumayag S, Kovacs B, Valle D. MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster. *J Biol Chem.* 2007 Aug 24; **282(34)**: 25053-66.
- Xu Y, Chen XT, Luo M, Tang Y, Zhang G, Wu D, *et al.* Multiple epigenetic factors predict the attention deficit/hyperactivity disorder among the Chinese Han children. *J Psychiatr Res.* 2015 May; **64**: 40-50.
- Xu Z, Taylor JA. SNPinfo: integrating GWAS and candidate gene information into functional SNP selection for genetic association studies. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jul; **37(Web Server issue)**: W600-5.

Y

- Yamada K, Iwayama Y, Hattori E, Iwamoto K, Toyota T, Ohnishi T, *et al.* Genome-wide association study of schizophrenia in Japanese population. *PLoS One.* 2011; **6(6)**: e20468.
- Yamamoto H, Okuzaki D, Yamanishi K, Xu Y, Watanabe Y, Yoshida M, *et al.* Genetic analysis of genes causing hypertension and stroke in spontaneously hypertensive rats. *Int J Mol Med.* 2013 May; **31(5)**: 1057-65.
- Yang B, Chan RC, Jing J, Li T, Sham P, Chen RY. A meta-analysis of association studies between the 10-repeat allele of a VNTR polymorphism in the 3'-UTR of dopamine transporter gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2007 Jun 5; **144B(4)**: 541-50.

- Yang L, Neale BM, Liu L, Lee SH, Wray NR, Ji N, *et al.* Polygenic transmission and complex neuro developmental network for attention deficit hyperactivity disorder: genome-wide association study of both common and rare variants. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2013 Jul; **162B(5)**: 419-30.
- Ye C, Hu Z, Wu E, Yang X, Buford UJ, Guo Z, *et al.* Two SNAP-25 genetic variants in the binding site of multiple microRNAs and susceptibility of ADHD: A meta-analysis. *J Psychiatr Res.* 2016 Oct; **81**: 56-62.
- Yi JJ, Ehlers MD. Emerging roles for ubiquitin and protein degradation in neuronal function. *Pharmacol Rev.* 2007 Mar; **59(1)**: 14-39.
- Yin CL, Chen HI, Li LH, Chien YL, Liao HM, Chou MC, Genome-wide analysis of copy number variations identifies PARK2 as a candidate gene for autism spectrum disorder. *Mol Autism.* 2016 Apr 1; **7**: 23.
- Yoshida M, Watanabe Y, Yamanishi K, Yamashita A, Yamamoto H, Okuzaki D, *et al.* Analysis of genes causing hypertension and stroke in spontaneously hypertensive rats: gene expression profiles in the brain. *Int J Mol Med.* 2014 Apr; **33(4)**: 887-96.
- Young GS, Maharaj NJ, Conquer JA. Blood phospholipid fatty acid analysis of adults with and without attention deficit/hyperactivity disorder. *Lipids.* 2004 Feb; **39(2)**: 117-23.
- Young S, Gudjonsson GH. Growing out of ADHD: the relationship between functioning and symptoms. *J Atten Disord.* 2008 Sep; **12(2)**: 162-9.

Z

- Zayats T, Athanasiu L, Sonderby I, Djurovic S, Westlye LT, Tamnes CK, *et al.* Genome-wide analysis of attention deficit hyperactivity disorder in Norway. *PLoS One.* 2015 Apr 13; **10(4)**: e0122501.
- Zayats T, Jacobsen KK, Kleppe R, Jacob CP, Kittel-Schneider S, Ribasés M, *et al.* Exome chip analyses in adult attention deficit hyperactivity disorder. *Transl Psychiatry.* 2016 Oct 18; **6(10)**: e923.
- Zepf FD, Holtmann M, Stadler C, Demisch L, Schmitt M, Wöckel L, *et al.* Diminished serotonergic functioning in hostile children with ADHD: tryptophan depletion increases behavioural inhibition. *Pharmacopsychiatry.* 2008b Mar; **41(2)**: 60-5.
- Zepf FD, Holtmann M, Stadler C, Demisch L, Schmitt M, Wöckel L, Poustka F. Diminished serotonergic functioning in hostile children with ADHD: tryptophan depletion increases behavioural inhibition. *Pharmacopsychiatry.* 2008a Mar; **41(2)**: 60-5.
- Zepf FD, Wöckel L, Poustka F, Holtmann M. Diminished 5-HT functioning in CBCL pediatric bipolar disorder-profiled ADHD patients versus normal ADHD: susceptibility to rapid tryptophan depletion influences reaction time performance. *Hum Psychopharmacol.* 2008c Jun; **23(4)**: 291-9.
- Zhang C, Xu Y, Zhang HT, Gurney ME, O'Donnell JM. Comparison of the Pharmacological Profiles of Selective PDE4B and PDE4D Inhibitors in the Central Nervous System. *Sci Rep.* 2017 Jan 5; **7**: 40115.

- Zhang-James Y, DasBanerjee T, Sagvolden T, Middleton FA, Faraone SV. SLC9A9 mutations, gene expression, and protein-protein interactions in rat models of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2011 Dec; **156B(7)**: 835-43.
- Zhao H, Nyholt DR. Gene-based analyses reveal novel genetic overlap and allelic heterogeneity across five major psychiatric disorders. *Hum Genet*. 2017 Feb; **136(2)**: 263-274.
- Zhao J, Guo X, Du Y, Han Y, Wang Y, Li L, *et al*. Correlative study of peripheral ATP1A1 gene expression level to anxiety severity score on major depressive disorder patients. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2016a Nov 1; **27(6)**: 563-567.
- Zhao Y, Alexandrov PN, Jaber V, Lukiw WJ. Deficiency in the Ubiquitin Conjugating Enzyme UBE2A in Alzheimer's Disease (AD) is Linked to Deficits in a Natural Circular miRNA-7 Sponge (circRNA; ciRS-7). *Genes (Basel)*. 2016b Dec 5; **7(12)**. pii: E116.
- Zhou K, Dempfle A, Arcos-Burgos M, Bakker SC, Banaschewski T, Biederman J, *et al*. Meta-analysis of genome-wide linkage scans of attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2008 Dec 5; **147B(8)**: 1392-8.
- Zhou R, Yuan P, Wang Y, Hunsberger JG, Elkahlon A, Wei Y, *et al*. Damschroder-Williams P, Evidence for selective microRNAs and their effectors as common long-term targets for the actions of mood stabilizers. *Neuropsychopharmacology*. 2009 May; **34(6)**: 1395-405.
- Zolkowska D, Jain R, Rothman RB, Partilla JS, Roth BL, Setola V, *et al*. Evidence for the involvement of dopamine transporters in behavioral stimulant effects of modafinil. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009 May; **329(2)**: 738-46.
- Zovoilis A, Agbemenyah HY, Agis-Balboa RC, Stilling RM, Edbauer D, Rao P, *et al*. microRNA-34c is a novel target to treat dementias. *EMBO J*. 2011; **30**: 4299-4308.
- Zwirs BW, Burger H, Schulpen TW, Wiznitzer M, Fedder H, Buitelaar JK. Prevalence of psychiatric disorders among children of different ethnic origin. *J Abnorm Child Psychol*. 2007 Aug; **35(4)**: 556-66.

ANNEX

1. Annex 1

Article 1

Sánchez-Mora C, Ramos-Quiroga JA, García-Martínez I, Fernández-Castillo N, Bosch R, Richarte V, Palomar G, Nogueira M, Corrales M, Daigre C, Martínez-Luna N, Grau-Lopez L, Toma C, Cormand B, Roncero C, Casas M, Ribasés M. **Evaluation of single nucleotide polymorphisms in the miR-183-96-182 cluster in adulthood attention-deficit and hyperactivity disorder (ADHD) and substance use disorders (SUDs).** *European Neuropsychopharmacology*. 2013 Nov; **23(11)**: 1463-73.



ELSEVIER

www.elsevier.com/locate/euroneuro



Evaluation of single nucleotide polymorphisms in the miR-183-96-182 cluster in adulthood attention-deficit and hyperactivity disorder (ADHD) and substance use disorders (SUDs)



Cristina Sánchez-Mora^{a,b,c}, Josep-Antoni Ramos-Quiroga^{b,c,d},
Iris Garcia-Martínez^{a,b}, Noelia Fernández-Castillo^{f,g,h}, Rosa Bosch^{b,c},
Vanesa Richarte^b, Gloria Palomar^b, Mariana Nogueira^b,
Montse Corrales^b, Constanza Daigre^{b,e}, Nieves Martínez-Luna^{b,e},
Lara Grau-Lopez^{b,e}, Claudio Toma^{f,g,h}, Bru Cormand^{f,g,h},
Carlos Roncero^{b,c,d,e}, Miguel Casas^{b,c,d}, Marta Ribasés^{a,b,c,*}

^aPsychiatric Genetics Unit, Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), Barcelona, Catalonia, Spain

^bDepartment of Psychiatry, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Catalonia, Spain

^cBiomedical Network Research Centre on Mental Health (CIBERSAM), Barcelona, Catalonia, Spain

^dDepartment of Psychiatry and Legal Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Catalonia, Spain

^eOutpatient Drug Clinic (CAS) Vall d'Hebron, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Public Health Agency of Barcelona (ASPB), Barcelona, Spain

^fDepartament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Catalonia, Spain

^gCentro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain

^hInstitut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Catalonia, Spain

Received 24 January 2013; received in revised form 28 May 2013; accepted 5 July 2013

KEYWORDS

ADHD;
SUD;
miRNA;
Case-control
association study;
SNP;
HTR1B

Abstract

Attention deficit-hyperactivity disorder (ADHD) is a neuropsychiatric disorder characterized by inappropriate and impaired levels of hyperactivity, impulsivity and inattention. Around 75% of adults with ADHD show comorbidity with other psychiatric disorders such as disruptive behavior disorders or substance use disorders (SUDs). Recently, there has been growing interest in studying the role of microRNAs (miRNAs) in the susceptibility to complex disorders. Interestingly, converging evidence suggests that single nucleotide polymorphisms (SNPs) within miRNAs or miRNA target sites may modulate the miRNA-mediated regulation of gene expression through the

*Corresponding author at: Psychiatric Genetics Unit, Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), Barcelona, Catalonia, Spain. Tel.: +34 932746734.
E-mail address: mrribases@ir.vhebron.net (M. Ribasés).

alteration of the miRNA maturation, structure or expression pattern as well as the silencing mechanisms of target genes. Genetic studies and animal models support the involvement of the serotonin receptor (*HTR1B*) in ADHD. We evaluated the contribution of one SNP in the miR-96 target site at *HTR1B* and eight tagSNPs within the genomic region containing this miRNA in 695 adults with ADHD (266 and 396 subjects with and without comorbid SUD, respectively), 403 subjects with SUD without life-time diagnosis of ADHD and 485 sex-matched controls from Spain. Single and multiple marker analyses revealed association between two SNPs located at the 3' region of miR-96 (rs2402959 and rs6965643) and ADHD without SUD. Our results provide preliminary evidence for the contribution of two sequence variants at the miR-183-96-182 cluster to ADHD without comorbid SUD, and emphasize the need to take comorbidities into account in genetic studies to minimize the effect of heterogeneity and to clarify these complex phenotypes.

© 2013 Elsevier B.V. and ECNP. All rights reserved.

1. Introduction

Attention deficit-hyperactivity disorder (ADHD) is a neuropsychiatric disorder affecting 4-8% of children characterized by inappropriate and impaired levels of hyperactivity, impulsivity and inattention, with an average heritability estimated around 76% (Faraone and Mick, 2010; Faraone et al., 2005; Polanczyk et al., 2007). In approximately 65% of ADHD cases, the disorder persists into adulthood either as a full condition or in partial remission (Faraone et al., 2006; Lara et al., 2009). Around 75% of adults with ADHD show comorbidity with other psychiatric disorders such as anxiety, affective disturbances or substance use disorders (SUDs) (Fayyad et al., 2007; McGough et al., 2005). Specifically, individuals whose ADHD persists into adulthood have approximately a 50% lifetime risk of developing any SUD and patients with SUD present a higher prevalence of ADHD than general population. In a recent meta-analysis, the mean ADHD prevalence in SUD patients was estimated to be 25.3% in adolescents and 21.0% in adults (Biederman et al., 1995; Daigre et al., 2013a, 2013b; DeMilio, 1989; van Emmerik-van Oortmersen et al., 2012; Wilens and Biederman, 2006). This link between ADHD and SUDs has been documented in family members of both adults and children with ADHD. In this regard, follow-up studies have shown a higher risk for SUD in adults with ADHD or in adults that had ADHD as children than in individuals without ADHD (Biederman et al., 2012; Kessler et al., 2006; Klein et al., 2012; Mannuzza et al., 1991). In addition, elevated rates of SUD have been described among relatives of children with ADHD, while the offspring of parents with SUD are at increased risk for ADHD or related symptoms (Biederman et al., 1992, 2008; Wilens et al., 1995). Despite the high incidence of SUD in subjects with ADHD and the studies that consistently show a genetic basis for the co-occurrence of these two conditions (Groman et al., 2009), little is known about the specific genetic factors that are involved in the joint development of these disorders. Until today, research has mainly focused on candidate genes of the dopamine, serotonin or norepinephrin neurotransmitter systems, showing controversial results (Arnsten and Pliszka, 2011; Banaschewski et al., 2010; Wu et al., 2012). Recently, Carpentier et al. (2013) evaluated the association of six candidate genes with ADHD and/or SUDs and identified both shared as well as ADHD-specific vulnerability factors.

Besides the genetic background, co-occurrence of other major psychiatric disorders, such as conduct disorder (CD) or oppositional defiant disorder (ODD), are also risk factors for the

development of SUD in ADHD patients. Along this line, among the patients with ADHD that are more vulnerable to develop SUD later in life are those who have comorbid CD or ODD. Additionally, there is evidence that co-occurrence of ADHD and CD symptoms contributes in an epistatic manner to a more severe form of SUD as compared to ADHD or CD alone (Flory et al., 2003; Katusic et al., 2005; Klein et al., 2012; Kollins, 2008).

More recently, there has been growing interest in studying the role of post-transcriptional regulatory elements in the susceptibility to different complex disorders. MicroRNAs (miRNAs) are 18-25 nucleotides single-stranded non-coding RNAs that play an important role in the regulation of gene expression at the post-transcriptional level (Lewis et al., 2003). Mature miRNAs bind to target mRNAs through a 3'UTR interaction region of about 6-8 nucleotides. Once the interaction is established, and depending on the degree of complementarity between the two strands, mRNA translation is repressed either by interference with ribosome binding or by destabilization or degradation of the mRNA molecule (Prosser et al., 2011; Rana, 2007). Through this mechanism, miRNAs regulate approximately 60% of human protein-coding gene expression at the posttranscriptional level (Ambros, 2004; Friedman et al., 2009; Lewis et al., 2005). Computational estimations indicate that there are more than 800 miRNAs in the human genome (Griffiths-Jones et al., 2008) and the study of their expression profiles has contributed to the understanding of the role of these non-coding RNA molecules in different biological processes found altered in complex diseases, such as cell development, differentiation or oncogenesis (Barbarotto et al., 2008). In the central nervous system, miRNAs are abundant and participate in neuronal survival, development, differentiation and neuronal function (Schratt et al., 2006; Vo et al., 2005). Also, several studies on their possible involvement in different psychiatric disorders, such as schizophrenia, bipolar disorder or autism have shown promising results (Abelson et al., 2005; Beveridge et al., 2008, 2010; Fiore et al., 2008; Hunsberger et al., 2009; Jensen et al., 2009; Shi et al., 2012; Wu et al., 2010). In this context, alterations in miRNA profiles have been described in postmortem brain tissues from schizophrenia patients (Beveridge et al., 2008, 2010; Gardiner et al., 2012; Kim et al., 2010). Along this line, Lai et al. (2011) evaluated the expression profile of 365 miRNAs in leukocytes and identified seven miRNAs with differential expression between schizophrenia patients and controls, alterations that were subsequently replicated in an independent sample for hsa-miR-34. Noteworthy, aberrant expression profiles of miRNAs were also

described in autism spectrum disorders (hsa-miR-23a, hsa-miR-134 and hsa-miR-146b) and Tourette's syndrome (hsa-miR-189) (Abelson et al., 2005; Talebizadeh et al., 2008).

Interestingly, converging evidence suggests that single nucleotide polymorphisms (SNPs) within miRNAs or miRNA target sites may modulate the miRNA-mediated regulation of gene expression (Borel and Antonarakis, 2008; Saunders et al., 2007). The first demonstration that mutations in a miRNA target site may have phenotypic consequences came from a study of Tourette's syndrome, where a SNP within the binding site for miR-189 at the 3'UTR of *SLTRK1* facilitates the miRNA-mediated downregulation of the gene (Abelson et al., 2005). Thus, genetic changes in post-transcriptional regulatory elements might lead to variation in the dosage of proteins and contribute to the susceptibility of different disorders, as described for papillary thyroid carcinoma, Parkinson's disease, asthma, and anxiety disorders or schizophrenia (Gong et al., 2013; Jazdzewski et al., 2008; Muinos-Gimeno et al., 2009; Tan et al., 2007; Wang et al., 2008). Although no previous studies have analyzed SNPs within miRNAs in ADHD, it is worth mentioning that Kovacs-Nagy et al. evaluated *in silico* the effect in miRNA binding of two SNPs located in the putative miRNA-binding site of the *SNAP-25* gene and found that both sequence variants, rs3746544 and rs1051312, previously associated with ADHD, may influence hsa-miR-510 and hsa-miR-641 binding and, thus, have an effect on *SNAP-25* expression (Kovacs-Nagy et al., 2011).

In addition, recent studies suggest that a sequence variant in the 3'UTR of the serotonin receptor 1B gene (*HTR1B*; rs13212041), which disrupts the binding site for miR-96 and, thus, moderates the miR-96-mediated regulation of its expression, is associated with aggressive behaviors that often co-occur with ADHD (Conner et al., 2010; Jensen et al., 2009). Interestingly, genetic studies and animal models support the involvement of *HTR1B* in ADHD and in the methylphenidate-induced locomotor activity in rat (Banerjee et al., 2012; Brunner et al., 1999; Guimaraes et al., 2009; Hawi et al., 2002; Quist et al., 2003; Saudou et al., 1994). Based on the hypothesis that sequence variants within this miRNA or its target site in *HTR1B* may contribute to the genetic susceptibility to ADHD as well as to comorbid CD, ODD and/or SUD, we genotyped nine sequence variants within the genomic regions containing miR-96 or its target site in *HTR1B* in 695 adults with ADHD and 485 sex-matched unrelated controls from Spain. Afterwards, those markers found associated with ADHD were further evaluated in an independent sample of SUD without life-time diagnosis of ADHD.

2. Experimental procedures

2.1. Patients and controls

2.1.1. ADHD sample

The ADHD sample consisted of 695 adult ADHD patients (mean age 37.17 ± 10.65 years and 68.78% males ($n=478$)) recruited and evaluated at the Psychiatry Department of the Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona, Spain) according to DSM-IV TR criteria. ADHD diagnosis was based on the Spanish version of the Conners Adult ADHD Diagnostic Interview for DSM-IV (CAADID) (Ramos-Quiroga et al., 2012). Thirty-seven percent of ADHD patients ($n=261$) fulfilled diagnosis criteria for SUD and 21% for disruptive behavior disorders (CD and/or ODD; $n=144$). Comorbidity was

assessed by Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I and Axis II Disorders (SCID-I and SCID-II) (First et al., 1999a, 1999b). Oppositional Defiant Disorder (ODD) during childhood and adolescence was retrospectively evaluated with the Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia (SADS) for School-Age Children (Kiddie SADS) present and lifetime version (K-SADS) (Orvaschel et al., 1995). The level of impairment was measured by the Clinical Global Impression (CGI) included in the CAADID Part II and the Sheehan Disability Inventory. Exclusion criteria for the ADHD patients cohorts were $IQ < 80$; pervasive developmental disorders; schizophrenia or other psychotic disorders; the presence of mood, anxiety or personality disorders that might explain ADHD symptoms; birth weight ≤ 1.5 kg; and other neurological or systemic disorders that might explain ADHD symptoms.

2.1.2. SUD sample

The SUD sample consisted of 403 adults (mean age 39.9 ± 9.20 years and 73.95% males ($n=298$)) recruited and evaluated at the Drug Unit of the Psychiatry Department at the Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona, Spain) with the Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID-I) (First et al., 1999b). All patients fulfilled DSM-IV criteria for drug dependence. None of them met lifetime diagnostic criteria for ADHD according to the Spanish version of the Conners Adult ADHD Diagnostic Interview for DSM-IV (CAADID) (Ramos-Quiroga et al., 2012).

2.1.3. Controls

The control sample (mean age 52.61 ± 14.80 years and 74.23% males ($n=360$)) consisted of blood donors matched for sex with the ADHD group in which DSM-IV lifetime ADHD symptomatology was excluded under the following criteria: (1) not having been diagnosed with ADHD and (2) answering negatively to the lifetime presence of the following DSM-IV ADHD symptoms: (a) often has trouble keeping attention on tasks, (b) often loses things needed for tasks, (c) often fidgets with hands or feet or squirms in seat and (d) often gets up from seat when remaining in seat is expected. None of them had injected drugs intravenously.

All patients and controls were Spanish and Caucasian (Table 1). The study was approved by the ethics committee of our institution and informed consent was obtained from all subjects in accordance with the Helsinki Declaration.

2.2. DNA isolation, selection of SNPs and genotyping

Genomic DNA was isolated either from saliva using the Oragene-DNA self-collection kit from DNA Genotek (DNA Genotek Inc., Ottawa, Canada) or from peripheral blood lymphocytes by the salting-out procedure (Miller et al., 1988). DNA concentrations were determined using the PicoGreen dsDNA Quantitation Kit (Molecular Probes, Eugene, Oregon).

Since miR-96 is clustered in an intergenic region with two other miRNA genes, miR-183 and miR-182, and all of them are transcribed as a single polycistronic transcript, for the tagSNP selection we considered a genomic region including the miR-183-96-182 cluster plus 10 kb proximal and 5 kb distal flanking sequences (chr7:129192459-129212090). SNP selection was based on genetic coverage criteria ($r^2 > 0.80$) considering SNPs with a minor allele frequency (MAF) > 0.05 from the CEPH panel of the HapMap database (www.hapmap.org; release 28) and using the Haploview v.4.2 software (Barrett et al., 2005). Under these conditions, we selected a total of six tagSNPs covering, in terms of linkage disequilibrium, the genomic region that contains the miR-183-96-182 cluster (Table S1; Figure 1). Three additional SNPs located within the stem loop of the miR-96 precursor (pre-miR-96; rs73159662 and rs41274239) or at the miR-96 binding site of the *HTR1B* gene (rs13212041) were also included in the analysis (Figure 1). Genotyping was performed using the Sequenom technol

Table 1 Descriptive characteristics of the Caucasian sample of ADHD, SUD and controls.

	ADHD sample, N=695	SUD sample, N=403	Controls sample, N=485
Gender N (%)			
Male	478 (68.78)	300 (74.44)	360 (74.23)
Female	217 (31.22)	103 (25.56)	125 (25.77)
Age (mean and SD)	37.17 ± 10.65	37.61 ± 8.94	52.61 ± 14.80
ADHD subtypes N (%)			
Combined type	425 (61.5)	-	-
Inattentive type	237 (34.10)	-	-
Hyperactive/impulsive type	23 (3.31)	-	-
Sub-threshold	1 (0.14)	-	-
Unknown	9 (1.29)	-	-
SUD N (%)			
Total SUD^a	261	403	-
Cocaine	137 (52.5)	331 (82.13)	-
Alcohol	152 (58.2)	214 (53.10)	-
Cannabis	190 (72.5)	141 (34.99)	-
Opiates	12 (4.6)	89 (22.08)	-
Amphetamines and metamphetamines	31 (11.9)	26 (6.45)	-
Benzodiazepines	17 (6.5)	58 (14.39)	-
Others	41 (15.7)	33 (8.19)	-
Disruptive behavior disorders (CD and/or ODD)			
Non CD and/or ODD	458 (65.9)	-	-
CD and/or ODD	144 (20.72)	-	-
Non evaluated	93 (13.38)	-	-

^aAbuse and/or dependence.

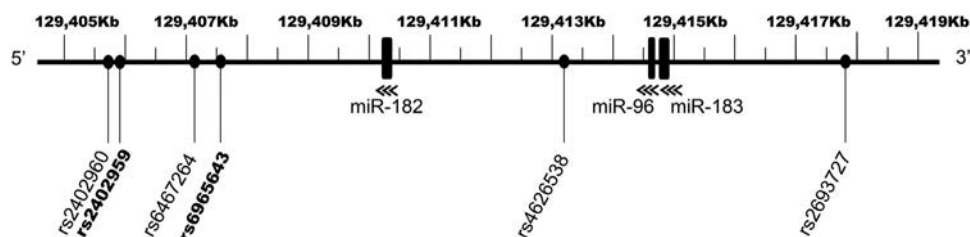


Figure 1 Location of the six markers selected in the miR-183-96-182 cluster region plus 10 kb proximal and 5 kb distal sequences (chr7:129192459-129212090).

ogy at the Barcelona node of the Spanish National Genotyping Center (CeGen; www.cegen.org). Two CEPH DNA samples (NA11992 and NA11993) were included in the different genotyping assays, and a concordance rate of 100% with HapMap data was obtained. Replicates were also included in all plates as an additional quality control, and genotype concordance was also 100%.

2.3. Statistical analysis

To better understand the genetic contribution to adulthood ADHD we first analyzed the whole ADHD sample and afterwards considered comorbid disruptive behavior disorders or SUD in the association study. Those markers found associated with or without drug dependence in the ADHD sample were subsequently evaluated in an independent sample of SUD without lifetime diagnosis of

ADHD. The analysis of minimal statistical power was performed *post hoc* using the Genetic Power Calculator software (Purcell et al., 2003) assuming an odds ratio (OR) of 1.3, prevalence of 0.05, significance level of 0.05 and the lowest MAF of 0.112. Genetic stratification in our sample was previously discarded by analyzing a set of 48 anonymous SNPs with three different approaches that include the STRUCTURE software, the F_{ST} coefficient and the Prichard and Rosenberg method (Fernandez-Castillo et al., 2013; Ribases et al., 2009, 2008; Rosenberg et al., 2005). The analysis of Hardy-Weinberg equilibrium and the comparison of genotype frequencies under a log-additive model of inheritance were performed using the SNPAssoc R package (Gonzalez et al., 2007). Only SNPs following a genotypic distribution in the Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.05$) in the control sample were included in the analysis. To minimize multiple testing and type I errors, we decide *a priori* to restrict the multiple-marker analysis to those SNPs displaying

nominal association in the single-marker study. Haplotypes were estimated and assigned to individuals using the PHASE 2.0 software (Stephens et al., 2001). Subsequently, we compared haplotype frequencies under a log-additive model of inheritance with the SNPpass R package (Gonzalez et al., 2007). Epistatic effects were evaluated by taking the two genetic markers of interest (SNPs or haplotypes) and comparing two different regression models by a likelihood ratio test with the SPSS 15.0 statistical package (SPSS Inc., Chicago, USA). In the first model, we took the affection status as a dependent variable and the two risk genetic markers as predictive variables. In the second model, we included the interaction between both genetic factors as an independent variable in the logistic regression model. The Bonferroni correction for multiple testing considering seven SNPs corresponds to a significance threshold of $p < 0.007$. The SNP Function Prediction utility was used to detect potential functional effects of the associated variants (<http://snpinfo.niehs.nih.gov/snpinfo/snpfunc.htm>).

3. Results

We performed a case-control association study in a sample of 695 adult ADHD patients and 485 unrelated controls considering eight SNPs located within the genomic region that contains miR-96 (Figure 1) and one SNP in the 3'UTR miRNA binding site of the *HTR1B* gene. Two out of these nine SNPs (rs73159662 and rs41274239) were monomorphic in our sample and were excluded from the analysis (Table S1). The minimal statistical power of the sample considering a log-additive model of inheritance was 40.2%.

In the single-marker analysis, the comparison of genotype frequencies between the whole ADHD sample and the control group showed no significant differences ($p > 0.05$). We then considered the presence or absence of comorbid disruptive behavior disorders (CD and/or ODD) or SUD. No significant differences were observed for any SNP when we compared ADHD with or without comorbid disruptive behavior disorders with controls, or when ADHD with SUD was considered (data not shown). However, two SNPs located downstream from miR-96 displayed nominal association with ADHD without comorbid SUD (rs2402959: $p = 0.047$, OR: 1.25 (1.0-1.56) and rs6965643: $p = 0.029$, OR: 1.31 (1.02-1.66); Table 2). Consistently, these differences remained significant for rs6965643 when ADHD with neither SUD nor disruptive behavior disorders was compared with the control group ($p = 0.038$; OR 1.31 (1.01-1.69)).

The two SNPs within the flanking region of miR-96 identified in the single-marker study were further investigated using a haplotype-based test in the ADHD without SUD dataset. The analysis of multiple-markers under a log-additive model of inheritance revealed overrepresentation of the rs2402959T/rs6965643A haplotype ($p = 0.037$; OR: 1.25 (1.01-1.56)) and underrepresentation of the rs2402959C/rs6965643G haplotype ($p = 0.024$; OR: 1.36 (1.04-1.81)) in the sample of ADHD without SUD (Table 3a). Consistently, these differences remained significant when the subgroups of ADHD patients with and without SUD were compared to each other (rs2402959T/rs6965643A ($p = 0.02$; OR: 1.32 (1.03-1.70)) and rs2402959C/rs6965643G ($p = 0.03$; OR: 1.40 (1.02-1.93); data not shown). Underrepresentation of the rs2402959C/rs6965643G haplotype was also identified in the ADHD group with neither SUD nor disruptive behavior disorders ($p = 0.01$; OR: 1.44 (1.07-1.96); Table 3b).

Table 2 Single-marker association study in 396 adult ADHD patients without SUD and 485 sex-matched unrelated controls.

Locus	Marker	Region	Genotypes (11-12-22)				Cases N (%)				p-Value ^a (OR – 95% CI)	
			Controls N (%)		Sum		11		12			Sum
			11	12	22	Sum	11	12	22	Sum		
miR96	rs2402960	129.405.774	248 (51.1)	205 (42.3)	32 (6.6)	485	199 (50.3)	157 (39.6)	40 (10.1)	396	0.294	
	rs2402959	129.405.807	250 (51.5)	197 (40.6)	38 (7.8)	485	219 (55.3)	156 (39.4)	21 (5.3)	396	0.047; 1.25 (1.0-1.56) ^b	
	rs6467264	129.407.261	169 (34.8)	233 (48.0)	83 (17.0)	485	144 (36.4)	191 (48.2)	61 (15.4)	396	0.321	
	rs6965643	129.407.564	294 (60.6)	171 (35.5)	20 (4.1)	485	259 (65.4)	128 (32.3)	9 (2.3)	396	0.029; 1.31 (1.02-1.66) ^b	
	rs4626538	129.413.188	135 (28.0)	242 (50.1)	106 (21.9)	483	116 (29.4)	197 (50.0)	81 (20.6)	394	0.342	
	rs2693727	129.417.730	383 (79.0)	96 (19.8)	6 (1.2)	485	315 (79.7)	77 (19.5)	3 (0.8)	395	0.558	
5HTR1B	rs13212041	78.171.124	332 (68.7)	136 (28.2)	15 (3.1)	483	275 (69.4)	116 (29.3)	5 (1.3)	396	0.478	

^aCochran-Armitage's Trend Test.

^bWhen OR < 1, inverted score is shown.

Table 3 Multiple-marker association study (rs2402959/rs6965643) in (a) a clinical sample of 396 adult ADHD patients without SUD and 488 controls, and (b) a clinical sample of 318 adult ADHD patients without SUD or disruptive behavior disorders and 485 controls.

Marker haplotype	Controls N (%)				Cases N (%)				p-value (OR –95% CI)
	0 Copies	1 Copy	2 Copies	Sum	0 Copies	1 Copy	2 Copies	Sum	
(a)									
CG	332 (68.5)	143 (29.5)	10 (2.1)	485	290 (73.2)	103 (26.0)	3 (0.8)	396	0.024; 1.36 (1.04-1.81) ^a
TA	48 (9.9)	225 (46.4)	212 (43.7)	485	27 (6.8)	181 (45.7)	188 (47.5)	396	0.037; 1.25 (1.01-1.56) ^a
(b)									
CG	332 (68.5)	143 (29.5)	10 (2.1)	485	238 (74.8)	77 (24.2)	3 (0.9)	318	0.013; 1.44 (1.07-1.96) ^a
TA	48 (9.9)	225 (46.4)	212 (43.7)	485	23 (7.2)	145 (45.6)	150 (47.2)	318	-

^aWhen OR < 1, inverted score is shown.

To confirm that the association between ADHD and miR-96 was dependent on the SUD condition and exclusive of patients without comorbid SUD, we considered an additional sample of 403 SUD patients in which lifetime ADHD was excluded. Consistently, no association between SUD and rs2402959 or rs6965643 was observed neither in the single-marker nor in the multiple-marker analyses ($p > 0.05$; data not shown).

We then evaluated the possible interaction between the risk haplotype identified at 3' from miR-96 (rs2402959/rs6965643) and rs13212041 in the microRNA target site of the *HTR1B* gene, and found no evidence supporting the existence of epistatic effects between these sequence variants in the risk to develop ADHD without comorbid SUD (data not shown).

4. Discussion

As far as we know, this is the first case-control association study in ADHD that evaluates the role of SNPs in miRNAs or miRNA target sites and, thus, with a potential involvement in the miRNA-mediated modulation of gene expression. Under the hypothesis that common variations in miR-96 or in its target binding site in the *HTR1B* gene may be related to the susceptibility to ADHD, we focused our attention on SNPs covering the chromosomal region that contains this miRNA. We also considered a variant located at the 3'UTR region of the *HTR1B* gene, previously associated with aggression-related phenotypes that often accompany ADHD and which has a role in the attenuation of the miR-96-mediated inhibition of *HTR1B* expression (Conner et al., 2010; Jensen et al., 2009).

Our results provide preliminary evidence for the contribution of two sequence variants downstream from miR-96 to ADHD without comorbid SUD. However, it is worth to mention that miR-96 is clustered in an intergenic region on 7q32.2 with two other miRNA genes, miR-183 and miR-182. Since these three miRNAs are transcribed as a single polycistronic transcript, the identified sequence variants may affect the expression profiles of the entire miR-183-96-182 cluster. Interestingly, alterations in this miRNA cluster, that is expressed in the central nervous system and shows

brain region-specific expression patterns (Juhila et al., 2011; Xu et al., 2007), could contribute to ADHD susceptibility through their effect not only on the post-transcriptional regulation of *HTR1B*, but also on other validated target genes such as *ADCY6*, *CLOCK* and/or *DSIP*, involved in the regulation of the circadian rhythm, or *RARG*, that participates in the control of dopamine signaling pathway (Baird et al., 2012; Feng et al., 2005; Goodman, 1998; Krezel et al., 1998; Saus et al., 2010; Xu et al., 2007). All these genes can be considered good candidates for being involved in ADHD.

The association between the miR-183-96-182 cluster and ADHD without comorbid SUD suggests the existence of a distinct genetic load between different ADHD subgroups and argues for specific genetic risks in ADHD patients with and without SUD. Since regular treatment with methylphenidate is less effective in ADHD patients with comorbid SUD (Faraone et al., 2007; Faraone and Upadhyaya, 2007; Huss et al., 2008; Wilens et al., 2003), confirmation of distinct genetic factors that would allow discerning between individuals with and without increased SUD risk would be particularly relevant from the preventive and therapeutic points of view (Kollins, 2008; Wilens et al., 2003). Because the genetic basis of ADHD remains largely unknown, this finding also points to the assessment of the ADHD comorbidity as an alternative approach to identify distinctive, homogeneous and consistent subgroups of ADHD that could facilitate the identification of underlying genetic factors. Along this line, clinical heterogeneity and differences in the frequency of comorbid disorders co-occurring with ADHD across populations may have contributed to the inconsistent and sometimes divergent results observed in previous association studies.

Although miRNAs are essential for synaptic plasticity, neuronal differentiation, development and maintenance (Barbato et al., 2007; Kim et al., 2007; Numakawa et al., 2011), little is known about their involvement in ADHD. However, recent studies have attempted to evaluate the impact of miRNAs in other psychiatric disorders and have reported alterations in miRNA biogenesis and/or expression in brain and peripheral blood cells in schizophrenia, bipolar disorder, major depression and/or suicide patients (Beveridge et al., 2008, 2010; Gardiner et al., 2012; Kim

et al., 2010; Lai et al., 2011; Rong et al., 2011; Smalheiser et al., 2012; Xu et al., 2010; Zhu et al., 2009). Because nicotine, alcohol or cocaine selectively modulates the expression of multiple miRNAs, the miRNA-mediated gene regulation may also underlie the molecular mechanisms involved in drug dependence (Hollander et al., 2010; Huang and Li, 2009; Im et al., 2010; Li and van der Vaart, 2011; Pietrzykowski et al., 2008). Finally, in addition to expression studies, different research groups have investigated genetic variants within or nearby brain-expressed miRNAs through case-control designs and found significant associations with schizophrenia, major depression or anxiety disorders (Hansen et al., 2007; Muinos-Gimeno et al., 2009; Saus et al., 2010).

However, our results should be interpreted in the context of several limitations. First, the relationship between ADHD and the miR-183-96-182 cluster was only identified when ADHD patients without SUD were considered, but not in ADHD with comorbid SUD or in SUD alone. These results are in line with previous studies pointing at differential genetic influences contributing to ADHD and SUD (Carpentier et al., 2013) and suggest that comorbidities should be considered in future genetic studies to identify reliable clinical subtypes, generate more homogeneous datasets and, eventually, shed more light into the role of genetic factors in ADHD (Buitelaar, 2005; Levy and Ebstein, 2009). Alternatively, discrepancies between ADHD with and without comorbid SUD could also be attributed to limited statistical power (40.2% considering a log-additive model of inheritance), additional genetic risk factors or differences in the frequency of other comorbid disorders co-occurring with ADHD and not considered in the present study.

Second, the association between the miR-183-96-182 cluster and ADHD should be considered preliminary until replication. In this regard, we have explored results from a meta-analysis of four previous genome-wide association studies in childhood ADHD, including 2064 trios, 896 cases and 2455 controls, and observed no statistically significant effects of the two SNPs at the 3' region of miR-96 (rs2402959 and rs6965643) on the risk of developing ADHD ($p=0.75$) (Neale et al., 2010). These results are consistent with the lack of association between the miR-183-96-182 cluster and the overall ADHD sample identified in our study. Because SUD data are not available in the childhood ADHD sample, follow-up studies of these patients may allow us to discern between individuals with and without symptomatic remission and/or comorbid SUD and, thus, to evaluate the involvement of the rs2402959 and rs6965643 in the subgroup of ADHD patients without comorbid SUD.

Third, because putative functional variants were not prioritized in the miRNA-96 SNP selection and the identified SNPs are located in the 3' flanking region of the miRNA cluster, the risk haplotype may have no functional consequences by itself. Rather, it may be in linkage disequilibrium with other functional variants that would be the ones directly involved in the genetic vulnerability to ADHD. Indeed, *in silico* predictions showed that none of the SNPs conforming the ADHD risk haplotype would have relevant functional effects. Unfortunately, two sequence variants located within the miR-96 precursor (rs73159662 and rs41274239), and thus with a potential direct effect in miRNA biogenesis and function, were not considered in the present study due to their low MAF values (Sun et al., 2009).

Fourth, the relatively small sample size may provide imprecise estimates of the magnitude of the observed effects and may also contribute to the lack of association found between ADHD with comorbid disruptive behavior disorders (CD and/or ODD) and the functional polymorphism in *HTR1B* that was previously associated with aggressive behaviors (Conner et al., 2010; Jensen et al., 2009). Since we used DSM-IV diagnostic criteria for CD or ODD in a clinical dataset rather than self-report of anger and hostility used in previous studies, discrepancies could also be attributed to clinical heterogeneity and measurements of aggression-related behaviors. And finally, although population stratification in our sample was previously tested to reduce the likelihood of type I errors (Ribases et al., 2008, 2009), we cannot overlook that the association between ADHD and miR-183-96-182 did not remain significant after adjusting for multiple testing using the Bonferroni correction. This method, however, requires independence between all performed tests and, therefore, may be too restrictive since some of the selected SNPs show some degree of LD.

In summary, although the functional sequence variants in the miR-183-96-182 cluster directly involved in ADHD remain unknown, we have identified a tentative association between this genomic region and ADHD without comorbid SUD. These results strengthen the hypothesis that SNPs modulating the expression of miRNA or their interactions with target mRNAs may impact the development and maintenance of a specific transcriptome and thus contribute to the genetic susceptibility to complex disorders such as ADHD. Furthermore, these results emphasize the need to take comorbidities into account in genetic studies to minimize the effect of heterogeneity and to identify genetic variants associated with a higher or lower risk of developing drug addiction in ADHD patients. This information could help to clarify these complex phenotypes and provide clues to the underlying biochemical pathways, information about predictive risk factors involved in the development of SUD later in life and more insight into the underlying disease mechanism.

Role of funding source

MR is a recipient of a Miguel de Servet contract from the "Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación", Spain, and CT was supported by the European Union (Marie Curie, PIEF-GA-2009-254930).

Financial support was received from "Instituto de Salud Carlos III-FIS" (CP09/00119, PI041267, PI040524, PI080519, PI11/00571, PI11/01629, PI12/01139), "Fundació La Marató de TV3" (Ref. 092330/31), "Plan Nacional Sobre Drogas" (PNSD#2011-0080), "Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca-AGAUR" (2009SGR1554, 2009SGR0971), "Ministerio de Economía y Competitividad" (SAF2012-33484) and "Departament de Salut", Government of Catalonia, Spain.

Contributors

Cristina Sánchez-Mora participated in the DNA isolation and genotyping assay design, undertook the statistical analyses and wrote the first draft of the manuscript.

Josep Antoni Ramos-Quiroga, Carlos Roncero, Rosa Bosch and Miquel Casas participate in the study design, clinical assessment and coordination of the clinical research.

Vanesa Richarte, Gloria Palomar, Mariana Nogueira, Montse Corrales, Constanza Daigre, Nieves Martínez-Luna and Lara

Grau-Lopez participated in the clinical assessment and in the recruitment of patients.

Noelia fernandez-Castillo, Iris Garcia-Martinez and Claudio Toma participated in the genotyping assay and the statistical analyses.

Bru Cormand and Marta Ribasés wrote the protocol, coordinated the genetic study design and statistical analysis and supervised the manuscript preparation.

All authors contributed to and have approved the final manuscript.

Conflict of interest

None of the authors have conflict of interests or relevant financial interests or personal affiliations in connection with the content of this manuscript.

Acknowledgments

We are grateful to all patients and controls for their participation in the study and to M.D. Castellà, B. Olivares, M. López and A. Daví for their help in the recruitment of control subjects.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2013.07.002>.

References

- Abelson, J.F., Kwan, K.Y., O'Roak, B.J., Baek, D.Y., Stillman, A.A., Morgan, T.M., Mathews, C.A., Pauls, D.L., Rasin, M.R., Gunel, M., Davis, N.R., Ercan-Sencicek, A.G., Guez, D.H., Spertus, J.A., Leckman, J.F., Dure, L.S.t., Kurlan, R., Singer, H.S., Gilbert, D. L., Farhi, A., Louvi, A., Lifton, R.P., Sestan, N., State, M.W., 2005. Sequence variants in SLITRK1 are associated with Tourette's syndrome. *Science* 310, 317-320.
- Ambros, V., 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350-355.
- Arnsten, A.F., Pliszka, S.R., 2011. Catecholamine influences on prefrontal cortical function: relevance to treatment of attention deficit/hyperactivity disorder and related disorders. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 99, 211-216.
- Baird, A.L., Coogan, A.N., Siddiqui, A., Donev, R.M., Thome, J., 2012. Adult attention-deficit hyperactivity disorder is associated with alterations in circadian rhythms at the behavioural, endocrine and molecular levels. *Mol. Psychiatry* 17, 988-995.
- Banaschewski, T., Becker, K., Scherag, S., Franke, B., Coghill, D., 2010. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: an overview. *Eur. Child. Adolesc. Psychiatry* 19, 237-257.
- Banerjee, E., Banerjee, D., Chatterjee, A., Sinha, S., Nandagopal, K., 2012. Selective maternal inheritance of risk alleles and genetic interaction between serotonin receptor-1B (5-HTR1B) and serotonin transporter (SLC6A4) in ADHD. *Psychiatry Res.* 200 (2-3), 1083-1085.
- Barbarotto, E., Schmittgen, T.D., Calin, G.A., 2008. MicroRNAs and cancer: profile, profile, profile. *Int. J. Cancer* 122, 969-977.
- Barbato, C., Ciotti, M.T., Serafino, A., Calissano, P., Cogoni, C., 2007. Dicer expression and localization in post-mitotic neurons. *Brain Res.* 1175, 17-27.
- Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J., Daly, M.J., 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21, 263-265.
- Beveridge, N.J., Gardiner, E., Carroll, A.P., Tooney, P.A., Cairns, M. J., 2010. Schizophrenia is associated with an increase in cortical microRNA biogenesis. *Mol. Psychiatry* 15, 1176-1189.
- Beveridge, N.J., Tooney, P.A., Carroll, A.P., Gardiner, E., Bowden, N., Scott, R.J., Tran, N., Dedova, I., Cairns, M.J., 2008. Dysregulation of miRNA 181b in the temporal cortex in schizophrenia. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1156-1168.
- Biederman, J., Faraone, S.V., Keenan, K., Benjamin, J., Krifcher, B., Moore, C., Sprich-Buckminster, S., Ugliaglia, K., Jellinek, M.S., Steingard, R., et al., 1992. Further evidence for family-genetic risk factors in attention deficit hyperactivity disorder. Patterns of comorbidity in probands and relatives psychiatrically and pediatrically referred samples. *Arch. Gen. Psychiatry* 49, 728-738.
- Biederman, J., Petty, C.R., Wilens, T.E., Faraone, M.G., Purcell, C.A., Mick, E., Monuteaux, M.C., Faraone, S.V., 2008. Familial risk analyses of attention deficit hyperactivity disorder and substance use disorders. *Am. J. Psychiatry* 165, 107-115.
- Biederman, J., Petty, C.R., Woodworth, K.Y., Lomedico, A., Hyder, L.L., Faraone, S.V., 2012. Adult outcome of attention-deficit/hyperactivity disorder: a controlled 16-year follow-up study. *J. Clin. Psychiatry* 73, 941-950.
- Biederman, J., Wilens, T., Mick, E., Milberger, S., Spencer, T.J., Faraone, S.V., 1995. Psychoactive substance use disorders in adults with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): effects of ADHD and psychiatric comorbidity. *Am. J. Psychiatry* 152, 1652-1658.
- Borel, C., Antonarakis, S.E., 2008. Functional genetic variation of human miRNAs and phenotypic consequences. *Mamm. Genome* 19, 503-509.
- Brunner, D., Buhot, M.C., Hen, R., Hofer, M., 1999. Anxiety, motor activation, and maternal-infant interactions in 5HT1B knockout mice. *Behav. Neurosci.* 113, 587-601.
- Buitelaar, J.K., 2005. ADHD: strategies to unravel its genetic architecture. *J. Neural Transm. Suppl.* 69, 1-17.
- Carpentier, P.J., Arias Vasquez, A., Hoogman, M., Onnink, M., Kan, C.C., Kooij, J.J., Makkinje, R., Iskandar, S., Kiemeny, L.A., de Jong, C.A., Franke, B., Buitelaar, J.K., 2013. Shared and unique genetic contributions to attention deficit/hyperactivity disorder and substance use disorders: a pilot study of six candidate genes. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2013 Jun;23(6):448-57.
- Conner, T.S., Jensen, K.P., Tennen, H., Furneaux, H.M., Kranzler, H. R., Covault, J., 2010. Functional polymorphisms in the serotonin 1B receptor gene (HTR1B) predict self-reported anger and hostility among young men. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 153B, 67-78.
- Daigre, C., Roncero, C., Grau-López, L., Martínez-Luna, N., Prat, G., Valero, S., Tejedor, R., Ramos-Quiroga, J.A., Casas, M., 2013a. Attention deficit hyperactivity disorder in cocaine-dependent adults: a psychiatric comorbidity analysis. *Am. J. Addict.* 10.1111/j.1521-0391.2012.12047.x.
- Daigre, C., Terán, A., García-Vicent, V., Roncero, C., 2013b. Attention deficit hyperactivity disorder and central nervous system depressant dependence. *Adicciones* 2013;25(2):171-186.
- DeMilio, L., 1989. Psychiatric syndromes in adolescent substance abusers. *Am. J. Psychiatry* 146, 1212-1214.
- 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, 159-165.
- Faraone, S.V., Biederman, J., Wilens, T.E., Adamson, J., 2007. A naturalistic study of the effects of pharmacotherapy on substance use disorders among ADHD adults. *Psychol. Med.* 37, 1743-1752.
- Faraone, S.V., Mick, E., 2010. Molecular genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr. Clin. North Am.* 33, 159-180.
- Faraone, S.V., Perlis, R.H., Doyle, A.E., Smoller, J.W., Goralnick, J.J., Holmgren, M.A., Sklar, P., 2005. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol. Psychiatry* 57, 1313-1323.

- Faraone, S.V., Upadhyaya, H.P., 2007. The effect of stimulant treatment for ADHD on later substance abuse and the potential for medication misuse, abuse, and diversion. *J. Clin. Psychiatry* 68, e28.
- Fayyad, J., De Graaf, R., Kessler, R., Alonso, J., Angermeyer, M., Demyttenaere, K., De Girolamo, G., Haro, J.M., Karam, E.G., Lara, C., Lepine, J.P., Ormel, J., Posada-Villa, J., Zaslavsky, A. M., Jin, R., 2007. Cross-national prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder. *Br. J. Psychiatry* 190, 402-409.
- Feng, J., Chen, J., Yan, J., Jones, I.R., Craddock, N., Cook Jr., E.H., Goldman, D., Heston, L.L., Sommer, S.S., 2005. Structural variants in the retinoid receptor genes in patients with schizophrenia and other psychiatric diseases. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 133B, 50-53.
- Fernandez-Castillo, N., Roncero, C., Grau-Lopez, L., Barral, C., Prat, G., Rodriguez-Cintas, L., Sanchez-Mora, C., Gratacos, M., Ramos-Quiroga, J.A., Casas, M., Ribases, M., Cormand, B., 2013. Association study of 37 genes related to serotonin and dopamine neurotransmission and neurotrophic factors in cocaine dependence. *Genes Brain Behav.* Feb 12 (1), 39-46 10.1111/gbb.12013. Epub 2013 Jan 10.
- Fiore, R., Siegel, G., Schratt, G., 2008. MicroRNA function in neuronal development, plasticity and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1779, 471-478.
- First, M.B., Gibbon, M., Spitzer, R.L., Williams, J.B.W., Smith, B., 1999a. Entrevista Clínica Estructurada para los Trastornos de la Personalidad del Eje II del DSM-IV. Masson, Barcelona.
- First, M.B., Gibbon, M., Williams, J.B.W., 1999b. Entrevista clínica estructurada para los trastornos del eje I del DSM-IV. Masson, Barcelona.
- Flory, K., Milich, R., Lynam, D.R., Leukefeld, C., Clayton, R., 2003. Relation between childhood disruptive behavior disorders and substance use and dependence symptoms in young adulthood: individuals with symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder and conduct disorder are uniquely at risk. *Psychol. Addict. Behav.* 17, 151-158.
- Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B., Bartel, D.P., 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19, 92-105.
- Gardiner, E., Beveridge, N.J., Wu, J.Q., Carr, V., Scott, R.J., Tooney, P.A., Cairns, M.J., 2012. Imprinted DLK1-DIO3 region of 14q32 defines a schizophrenia-associated miRNA signature in peripheral blood mononuclear cells. *Mol. Psychiatry*, 827-840.
- Gonzalez, J.R., Armengol, L., Sole, X., Guino, E., Mercader, J.M., Estivill, X., Moreno, V., 2007. SNPassoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* 23, 644-645.
- Goodman, A.B., 1998. Three independent lines of evidence suggest retinoids as causal to schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7240-7244.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., van Dongen, S., Enright, A.J., 2008. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucl. Acids Res.* 36, D154-D158.
- Groman, S.M., James, A.S., Jentsch, J.D., 2009. Poor response inhibition: at the nexus between substance abuse and attention deficit/hyperactivity disorder. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 33, 690-698.
- Gong, Y., Wu, C.N., Xu, J., Feng, G., Xing, Q.H., Fu, W., Li, C., He, L., Zhao, X.Z., 2013. Polymorphisms in microRNA target sites influence susceptibility to schizophrenia by altering the binding of miRNAs to their targets. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 10.1016/j.euroneuro.2012.12.002.
- Guimaraes, A.P., Schmitz, M., Polanczyk, G.V., Zeni, C., Genro, J., Roman, T., Rohde, L.A., Hutz, M.H., 2009. Further evidence for the association between attention deficit/hyperactivity disorder and the serotonin receptor 1B gene. *J. Neural Transm.* 116, 1675-1680.
- Hansen, T., Olsen, L., Lindow, M., Jakobsen, K.D., Ullum, H., Jonsson, E., Andreassen, O.A., Djurovic, S., Melle, I., Agartz, I., Hall, T., Timm, S., Wang, A.G., Werge, T., 2007. Brain expressed microRNAs implicated in schizophrenia etiology. *PLoS One* 2, e873.
- Hawi, Z., Dring, M., Kirley, A., Foley, D., Kent, L., Craddock, N., Asherson, P., Curran, S., Gould, A., Richards, S., Lawson, D., Pay, H., Turic, D., Langley, K., Owen, M., O'Donovan, M., Thapar, A., Fitzgerald, M., Gill, M., 2002. Serotonergic system and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): a potential susceptibility locus at the 5-HT(1B) receptor gene in 273 nuclear families from a multi-centre sample. *Mol. Psychiatry* 7, 718-725.
- Hollander, J.A., Im, H.I., Amelio, A.L., Kocerha, J., Bali, P., Lu, Q., Willoughby, D., Wahlestedt, C., Conkright, M.D., Kenny, P.J., 2010. Striatal microRNA controls cocaine intake through CREB signalling. *Nature* 466, 197-202.
- Huang, W., Li, M.D., 2009. Nicotine modulates expression of miR-140*, which targets the 3'-untranslated region of dynamin 1 gene (Dnm1). *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 12, 537-546.
- Hunsberger, J.G., Austin, D.R., Chen, G., Manji, H.K., 2009. MicroRNAs in mental health: from biological underpinnings to potential therapies. *Neuromol. Med.* 11, 173-182.
- Huss, M., Poustka, F., Lehmkuhl, G., Lehmkuhl, U., 2008. No increase in long-term risk for nicotine use disorders after treatment with methylphenidate in children with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): evidence from a non-randomised retrospective study. *J. Neural Transm.* 115, 335-339.
- Im, H.I., Hollander, J.A., Bali, P., Kenny, P.J., 2010. MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212. *Nat. Neurosci.* 13, 1120-1127.
- Jazdzewski, K., Murray, E.L., Franssila, K., Jarzab, B., Schoenberg, D.R., de la Chapelle, A., 2008. Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 7269-7274.
- Jensen, K.P., Covault, J., Conner, T.S., Tennen, H., Kranzler, H.R., Furneaux, H.M., 2009. A common polymorphism in serotonin receptor 1B mRNA moderates regulation by miR-96 and associates with aggressive human behaviors. *Mol. Psychiatry* 14, 381-389.
- Juhila, J., Sipila, T., Icaey, K., Nicorici, D., Ellonen, P., Kallio, A., Korpelainen, E., Greco, D., Hovatta, I., 2011. MicroRNA expression profiling reveals miRNA families regulating specific biological pathways in mouse frontal cortex and hippocampus. *PLoS One* 6, e21495.
- Katusic, S.K., Barbaresi, W.J., Colligan, R.C., Weaver, A.L., Leibson, C.L., Jacobsen, S.J., 2005. Psychostimulant treatment and risk for substance abuse among young adults with a history of attention-deficit/hyperactivity disorder: a population-based, birth cohort study. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* 15, 764-776.
- Kessler, R.C., Adler, L., Barkley, R., Biederman, J., Conners, C.K., Demler, O., Faraone, S.V., Greenhill, L.L., Howes, M.J., Secnik, K., Spencer, T., Ustun, T.B., Walters, E.E., Zaslavsky, A.M., 2006. The prevalence and correlates of adult ADHD in the United States: results from the National Comorbidity Survey Replication. *Am. J. Psychiatry* 163, 716-723.
- Kim, A.H., Reimers, M., Maher, B., Williamson, V., McMichael, O., McClay, J.L., van den Oord, E.J., Riley, B.P., Kendler, K.S., Vladimirov, V.I., 2010. MicroRNA expression profiling in the prefrontal cortex of individuals affected with schizophrenia and bipolar disorders. *Schizophr. Res.* 124, 183-191.
- Kim, J., Inoue, K., Ishii, J., Vanti, W.B., Voronov, S.V., Murchison, E., Hannon, G., Abeliovich, A., 2007. A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science* 317, 1220-1224.
- Klein, R.G., Mannuzza, S., Olazagasti, M.A., Roizen, E., Hutchison, J.A., Lashua, E.C., Castellanos, F.X., 2012. Clinical and functional outcome of childhood attention-deficit/hyperactivity disorder 33 years later. *Arch. Gen. Psychiatry* 69 (12), 1295-1303.

- Kollins, S.H., 2008. ADHD, substance use disorders, and psychostimulant treatment: current literature and treatment guidelines. *J. Atten. Disord.* 12, 115-125.
- Kovacs-Nagy, R., Sarkozy, P., Hu, J., Guttman, A., Sasvari-Szekely, M., Ronai, Z., 2011. Haplotyping of putative microRNA-binding sites in the SNAP-25 gene. *Electrophoresis* 32, 2013-2020.
- Krezel, W., Ghyselinck, N., Samad, T.A., Dupe, V., Kastner, P., Borrelli, E., Chambon, P., 1998. Impaired locomotion and dopamine signaling in retinoid receptor mutant mice. *Science* 279, 863-867.
- Lai, C.Y., Yu, S.L., Hsieh, M.H., Chen, C.H., Chen, H.Y., Wen, C.C., Huang, Y.H., Hsiao, P.C., Hsiao, C.K., Liu, C.M., Yang, P.C., Hwu, H.G., Chen, W.J., 2011. MicroRNA expression aberration as potential peripheral blood biomarkers for schizophrenia. *PLoS One* 6 (6), e21635.
- Lara, C., Fayyad, J., de Graaf, R., Kessler, R.C., Aguilar-Gaxiola, S., Angermeyer, M., Demyttenaere, K., de Girolamo, G., Haro, J. M., Jin, R., Karam, E.G., Lepine, J.P., Mora, M.E., Ormel, J., Posada-Villa, J., Sampson, N., 2009. Childhood predictors of adult attention-deficit/hyperactivity disorder: results from the World Health Organization World Mental Health Survey Initiative. *Biol. Psychiatry* 65, 46-54.
- Levy, Y., Ebstein, R.P., 2009. Research review: crossing syndrome boundaries in the search for brain endophenotypes. *J. Child Psychol. Psychiatry* 50, 657-668.
- Lewis, B.P., Burge, C.B., Bartel, D.P., 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15-20.
- Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., Burge, C. B., 2003. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115, 787-798.
- Li, M.D., van der Vaart, A.D., 2011. MicroRNAs in addiction: adaptation's middlemen? *Mol. Psychiatry* 16, 1159-1168.
- Mannuzza, S., Klein, R.G., Bonagura, N., Malloy, P., Giampino, T.L., Addalli, K.A., 1991. Hyperactive boys almost grown up. V. Replication of psychiatric status. *Arch. Gen. Psychiatry* 48, 77-83.
- McGough, J.J., Smalley, S.L., McCracken, J.T., Yang, M., Del'Homme, M., Lynn, D.E., Loo, S., 2005. Psychiatric comorbidity in adult attention deficit hyperactivity disorder: findings from multiplex families. *Am. J. Psychiatry* 162, 1621-1627.
- Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acids Res.* 16, 1215.
- Muinso-Gimeno, M., Guidi, M., Kagerbauer, B., Martin-Santos, R., Navines, R., Alonso, P., Menchon, J.M., Gratacos, M., Estivill, X., Espinosa-Parrilla, Y., 2009. Allele variants in functional MicroRNA target sites of the neurotrophin-3 receptor gene (NTRK3) as susceptibility factors for anxiety disorders. *Hum. Mutat.* 30, 1062-1071.
- Neale, B.M., Medland, S.E., Ripke, S., Asherson, P., Franke, B., Lesch, K.P., Faraone, S.V., Nguyen, T.T., Schäfer, H., Holmans, P., Daly, M., Steinhausen, H.C., Freitag, C., Reif, A., Renner, T. J., Romanos, M., Romanos, J., Walitza, S., Warnke, A., Meyer, J., Palmason, H., Buitelaar, J., Vasquez, A.A., Lambregts-Rommelse, N., Gill, M., Anney, R.J., Langely, K., O'Donovan, M., Williams, N., Owen, M., Thapar, A., Kent, L., Sergeant, J., Roeyers, H., Mick, E., Biederman, J., Doyle, A., Smalley, S., Loo, S., Hakonarson, H., Elia, J., Todorov, A., Miranda, A., Mulas, F., Ebstein, R.P., Rothenberger, A., Banaschewski, T., Oades, R.D., Sonuga-Barke, E., McGough, J., Nisenbaum, L., Middleton, F., Hu, X., Nelson, S., 2010. Psychiatric GWAS Consortium: ADHD Subgroup, 2010. Meta-analysis of genome-wide association studies of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 49, 884-897.
- Numakawa, T., Richards, M., Adachi, N., Kishi, S., Kunugi, H., Hashido, K., 2011. MicroRNA function and neurotrophin BDNF. *Neurochem. Int.* 59, 551-558.
- Orvaschel, H., Puig-Antich, J., Lauderdale, Fort, 1995. Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children: Epidemiologic Version, (5th version ed.) Nova Southeastern University, FL.
- Pietrzykowski, A.Z., Friesen, R.M., Martin, G.E., Puig, S.I., Nowak, C.L., Wynne, P.M., Siegelmann, H.T., Treisman, S.N., 2008. Posttranscriptional regulation of BK channel splice variant stability by miR-9 underlies neuroadaptation to alcohol. *Neuron* 59, 274-287.
- Polanczyk, G., de Lima, M.S., Horta, B.L., Biederman, J., Rohde, L.A., 2007. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and meta-regression analysis. *Am. J. Psychiatry* 164, 942-948.
- Prosser, H.M., Koike-Yusa, H., Cooper, J.D., Law, F.C., Bradley, A., 2011. A resource of vectors and ES cells for targeted deletion of microRNAs in mice. *Nat. Biotechnol.* 29, 840-845.
- Purcell, S., Cherny, S.S., Sham, P.C., 2003. Genetic power calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics* 19, 149-150.
- Quist, J.F., Barr, C.L., Schachar, R., Roberts, W., Malone, M., Tannock, R., Basile, V.S., Beitchman, J., Kennedy, J.L., 2003. The serotonin 5-HT1B receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Mol. Psychiatry* 8, 98-102.
- Ramos-Quiroga, J.A., Bosch, R., Richarte, V., Valero, S., Gomez-Barros, N., Nogueira, M., Palomar, G., Corrales, M., Saez-Francas, N., Corominas, M., Real, A., Vidal, R., Chalita, P.J., Casas, M., 2012. Criterion and concurrent validity of Conners Adult ADHD Diagnostic Interview for DSM-IV (CAADID) Spanish version. *Rev. Psiquiatr. Salud Ment.* 5, 229-235.
- Rana, T.M., 2007. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 23-36.
- Ribasés, M., Hervas, A., Ramos-Quiroga, J.A., Bosch, R., Bielsa, A., Gastaminza, X., Fernandez-Anguiano, M., Nogueira, M., Gomez-Barros, N., Valero, S., Gratacos, M., Estivill, X., Casas, M., Cormand, B., Bayes, M., 2008. Association study of 10 genes encoding neurotrophic factors and their receptors in adult and child attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol. Psychiatry* 63, 935-945.
- Ribasés, M., Ramos-Quiroga, J.A., Hervas, A., Bosch, R., Bielsa, A., Gastaminza, X., Artigas, J., Rodriguez-Ben, S., Estivill, X., Casas, M., Cormand, B., Bayes, M., 2009. Exploration of 19 serotonergic candidate genes in adults and children with attention-deficit/hyperactivity disorder identifies association for 5HT2A, DDC and MAOB. *Mol. Psychiatry* 14, 71-85.
- Rong, H., Liu, T.B., Yang, K.J., Yang, H.C., Wu, D.H., Liao, C.P., Hong, F., Yang, H.Z., Wan, F., Ye, X.Y., Xu, D., Zhang, X., Chao, C.A., Shen, Q.J., 2011. MicroRNA-134 plasma levels before and after treatment for bipolar mania. *J. Psychiatr. Res.* 45, 92-95.
- Rosenberg, N.A., Mahajan, S., Ramachandran, S., Zhao, C., Pritchard, J.K., Feldman, M.W., 2005. Clines, clusters, and the effect of study design on the inference of human population structure. *PLoS Genet.* 1, e70.
- Saudou, F., Amara, D.A., Dierich, A., LeMeur, M., Ramboz, S., Segu, L., Buhot, M.C., Hen, R., 1994. Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT1B receptor. *Science* 265, 1875-1878.
- Saunders, M.A., Liang, H., Li, W.H., 2007. Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 3300-3305.
- Saus, E., Soria, V., Escaramis, G., Vivarelli, F., Crespo, J.M., Kagerbauer, B., Menchon, J.M., Urretavizcaya, M., Gratacos, M., Estivill, X., 2010. Genetic variants and abnormal processing of pre-miR-182, a circadian clock modulator, in major depression patients with late insomnia. *Hum. Mol. Genet.* 19, 4017-4025.
- Schratt, G.M., Tuebing, F., Nigh, E.A., Kane, C.G., Sabatini, M.E., Kiebler, M., Greenberg, M.E., 2006. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* 439, 283-289.
- Shi, W., Du, J., Qi, Y., Liang, G., Wang, T., Li, S., Xie, S., Zeshan, B., Xiao, Z., 2012. Aberrant expression of serum miRNAs in schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.* 46, 198-204.

- Smalheiser, N.R., Lugli, G., Rizavi, H.S., Torvik, V.I., Turecki, G., Dwivedi, Y., 2012. MicroRNA expression is down-regulated and reorganized in prefrontal cortex of depressed suicide subjects. *PLoS One* 7, e33201.
- Stephens, M., Smith, N.J., Donnelly, P., 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 978-989.
- Sun, G., Yan, J., Noltner, K., Feng, J., Li, H., Sarkis, D.A., Sommer, S.S., Rossi, J.J., 2009. SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function. *RNA* 15, 1640-1651.
- Talebizadeh, Z., Butler, M.G., Theodoro, M.F., 2008. Feasibility and relevance of examining lymphoblastoid cell lines to study role of microRNAs in autism. *Autism Res.* 1, 240-250.
- Tan, Z., Randall, G., Fan, J., Camoretti-Mercado, B., Brockman-Schneider, R., Pan, L., Solway, J., Gern, J.E., Lemanske, R.F., Nicolae, D., Ober, C., 2007. Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 829-834.
- van Emmerik-van Oortmerssen, K., van de Glind, G., van den Brink, W., Smit, F., Crunelle, C.L., Swets, M., Schoevers, R.A., 2012. Prevalence of attention-deficit hyperactivity disorder in substance use disorder patients: a meta-analysis and meta-regression analysis. *Drug Alcohol Depend.* 122, 11-19.
- Vo, N., Klein, M.E., Varlamova, O., Keller, D.M., Yamamoto, T., Goodman, R.H., Impey, S., 2005. A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 16426-16431.
- Wang, G., van der Walt, J.M., Mayhew, G., Li, Y.J., Zuchner, S., Scott, W.K., Martin, E.R., Vance, J.M., 2008. Variation in the miRNA-433 binding site of FGF20 confers risk for Parkinson disease by overexpression of alpha-synuclein. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 283-289.
- Wilens, T.E., Biederman, J., 2006. Alcohol, drugs, and attention-deficit/hyperactivity disorder: a model for the study of addictions in youth. *J. Psychopharmacol.* 20, 580-588.
- Wilens, T.E., Biederman, J., Kiely, K., Bredin, E., Spencer, T.J., 1995. Pilot study of behavioral and emotional disturbances in the high-risk children of parents with opioid dependence. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 34, 779-785.
- Wilens, T.E., Faraone, S.V., Biederman, J., Gunawardene, S., 2003. Does stimulant therapy of attention-deficit/hyperactivity disorder beget later substance abuse? A meta-analytic review of the literature. *Pediatrics* 111, 179-185.
- Wu, J., Xiao, H., Sun, H., Zou, L., Zhu, L.Q., 2012. Role of dopamine receptors in ADHD: a systematic meta-analysis. *Mol. Neurobiol.* 45, 605-620.
- Wu, L., Zhao, Q., Zhu, X., Peng, M., Jia, C., Wu, W., Zheng, J., Wu, X.Z., 2010. A novel function of microRNA let-7d in regulation of galectin-3 expression in attention deficit hyperactivity disorder rat brain. *Brain Pathol.* 20, 1042-1054.
- Xu, B., Karayiorgou, M., Gogos, J.A., 2010. MicroRNAs in psychiatric and neurodevelopmental disorders. *Brain Res.* 1338, 78-88.
- Xu, S., Witmer, P.D., Lumayag, S., Kovacs, B., Valle, D., 2007. MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster. *J. Biol. Chem.* 282, 25053-25066.
- Zhu, Y., Kalbfleisch, T., Brennan, M.D., Li, Y., 2009. A MicroRNA gene is hosted in an intron of a schizophrenia-susceptibility gene. *Schizophr. Res.* 109, 86-89.

2. Annex 2

Article 3

Sánchez-Mora C, Ramos-Quiroga JA, Bosch R, Corrales M, García-Martínez I, Nogueira M, Págerols M, Palomar G, Richarte V, Vidal R, Arias-Vasquez A, Bustamante M, Forns J, Gross-Lesch S, Guxens M, Hinney A, Hoogman M, Jacob C, Jacobsen KK, Kan CC, Kiemeny L, Kittel-Schneider S, Klein M, Onnink M, Rivero O, Zayats T, Buitelaar J, Faraone SV, Franke B, Haavik J, Johansson S, Lesch KP, Reif A, Sunyer J, Bayés M, Casas M, Cormand B, Ribasés M. **Case-control genome-wide association study of persistent attention-deficit hyperactivity disorder identifies *FBXO33* as a novel susceptibility gene for the disorder.** *Neuropsychopharmacology*. 2015 Mar; **40(4)**: 915-26.

Case–Control Genome-Wide Association Study of Persistent Attention-Deficit Hyperactivity Disorder Identifies *FBXO33* as a Novel Susceptibility Gene for the Disorder

Cristina Sánchez-Mora^{1,2,3}, Josep A Ramos-Quiroga^{2,3,4}, Rosa Bosch^{2,3}, Montse Corrales², Iris García-Martínez^{1,2}, Mariana Nogueira², Mireia Pagerols^{1,2}, Gloria Palomar², Vanesa Richarte², Raquel Vidal², Alejandro Arias-Vasquez^{5,6,7}, Mariona Bustamante^{8,9,10,11}, Joan Fornés^{8,9,10}, Silke Gross-Lesch¹², Monica Guxens^{8,9,10}, Anke Hinney¹³, Martine Hoogman⁵, Christian Jacob¹², Kaya K Jacobsen¹⁴, Cornelis C Kan⁶, Lambertus Kiemeneij¹⁵, Sarah Kittel-Schneider¹², Marieke Klein⁵, Marten Onnink^{5,6}, Olga Rivero¹⁶, Tetyana Zayats¹⁴, Jan Buitelaar^{7,17}, Stephen V Faraone¹⁸, Barbara Franke^{5,6}, Jan Haavik¹⁴, Stefan Johansson¹⁴, Klaus-Peter Lesch¹⁶, Andreas Reif¹², Jordi Sunyer^{8,9,10}, Mònica Bayés¹⁹, Miguel Casas^{2,3,4}, Bru Cormand^{20,21,22,23} and Marta Ribasés^{*,1,2,3,23}

¹Psychiatric Genetics Unit, Group of Psychiatry, Mental Health and Addictions, Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ²Department of Psychiatry, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; ³Biomedical Network Research Centre on Mental Health (CIBERSAM), Barcelona, Spain; ⁴Department of Psychiatry and Legal Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ⁵Department of Human Genetics, Radboud University Medical Center, Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour, Nijmegen, The Netherlands; ⁶Department of Psychiatry, Radboud University Medical Center, Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour, Nijmegen, The Netherlands; ⁷Department of Cognitive Neuroscience, Radboud University Medical Center, Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour, Nijmegen, The Netherlands; ⁸Centre for Research in Environmental Epidemiology (CREAL), Barcelona, Spain; ⁹IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Barcelona, Spain; ¹⁰CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain; ¹¹Centre for Genomic Regulation (CRG), Barcelona, Spain; ¹²Department of Psychiatry, Psychosomatics and Psychotherapy, University Hospital Würzburg, Würzburg, Germany; ¹³Department of Child and Adolescent Psychiatry, University Duisburg-Essen, Essen, Germany; ¹⁴Department of Biomedicine, University of Bergen, K.G. Jebsen Center for Research on Neuropsychiatric Disorders, Bergen, Norway; ¹⁵Department for Health Evidence, Radboud University Medical Center, Radboud Institute for Health Sciences, Nijmegen, The Netherlands; ¹⁶Division of Molecular Psychiatry, Department of Psychiatry, Psychosomatics and Psychotherapy, University Hospital Würzburg, Würzburg, Germany; ¹⁷Karakter Child and Adolescent Psychiatry University Centre, Nijmegen, The Netherlands; ¹⁸Departments of Psychiatry and Neuroscience & Physiology, SUNY Upstate Medical University, Syracuse, NY, USA; ¹⁹Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG), Parc Científic de Barcelona (PCB), Barcelona, Spain; ²⁰Department of Genetics, University of Barcelona, Catalonia, Spain; ²¹Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Madrid, Spain; ²²Institute of Biomedicine of the University of Barcelona (IBUB), Catalonia, Spain

Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) is a neurodevelopmental disorder with high heritability. At least 30% of patients diagnosed in childhood continue to suffer from ADHD during adulthood and genetic risk factors may play an essential role in the persistence of the disorder throughout lifespan. To date, genome-wide association studies (GWAS) of ADHD have been completed in seven independent datasets, six of which were pediatric samples and one on persistent ADHD using a DNA-pooling strategy, but none of them reported genome-wide significant associations. In an attempt to unravel novel genes for the persistence of ADHD into adulthood, we conducted the first two-stage GWAS in adults with ADHD. The discovery sample included 607 ADHD cases and 584 controls. Top signals were subsequently tested for replication in three independent follow-up samples of 2104 ADHD patients and 1901 controls. None of the findings exceeded the genome-wide threshold for significance ($P_{GC} < 5e - 08$), but we found evidence for the involvement of the *FBXO33* (*F-box only protein 33*) gene in combined ADHD in the discovery sample ($P = 9.02e - 07$) and in the joint analysis of both stages ($P = 9.7e - 03$). Additional evidence for a *FBXO33* role in ADHD was found through gene-wise and pathway enrichment analyses in our genomic study. Risk alleles were associated with lower *FBXO33* expression in lymphoblastoid cell lines and with reduced frontal gray matter volume in a sample of 1300 adult subjects. Our findings point for the first time at the ubiquitination machinery as a new disease mechanism for adult ADHD and establish a rationale for searching for additional risk variants in ubiquitination-related genes.

Neuropsychopharmacology (2015) **40**, 915–926; doi:10.1038/npp.2014.267; published online 26 November 2014

*Correspondence: Dr M Ribasés, Psychiatric Genetics Unit, Group of Psychiatry, Mental Health and Addictions, Vall d'Hebron Research Institute, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain, Tel: +1 34 93 274 67 34, Fax: +1 34 93 489 45 87, E-mail: mribases@ir.vhebron.net or marta.ribases@gmail.com

²³These authors contributed equally to this work.

Received 17 June 2014; revised 22 August 2014; accepted 5 September 2014; accepted article preview online 6 October 2014

INTRODUCTION

Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD; OMIM: 143465) is a neurodevelopmental disorder characterized by inappropriate levels of hyperactivity, impulsivity, and/or inattention that affects 5–6% of children and persists into adulthood in 30–50% of ADHD patients diagnosed in childhood (Faraone *et al*, 2000b; Kessler *et al*, 2005; Kooij *et al*, 2005). Previous work supports a strong genetic load in ADHD, which places it among the most heritable psychiatric disorders with an estimated heritability of 76% (Biederman, 2005; Biederman and Faraone, 2005; Franke *et al*, 2012).

The first investigations on genes underlying ADHD focused on genome-wide linkage studies or hypothesis-driven candidate gene association analyses. In most cases, however, these failed to identify consistent and replicable genetic factors and provide modest evidence for the involvement of some specific genes on the basis of meta-analysis (Faraone *et al*, 2005; Franke *et al*, 2012; Gizer *et al*, 2009). This situation, along with advances in high-throughput technologies, stimulated a turn towards genome-wide association studies (GWAS). To date, GWAS of ADHD have been completed in seven independent datasets, six of which used pediatric samples (Franke *et al*, 2009; Hinney *et al*, 2011; Lesch *et al*, 2008; Mick *et al*, 2010; Neale *et al*, 2008; Neale *et al*, 2010a; Stergiakouli *et al*, 2012; Yang *et al*, 2013). None of them reported genome-wide significant associations and, apart from the possible involvement of *cadherin 13* (*CDH13*) identified in three reports (Lesch *et al*, 2008; Neale *et al*, 2008; Neale *et al*, 2010a), there is limited overlap between them or with previous linkage or candidate gene association studies. In addition, none of the 'classic' candidate genes for ADHD were found among the top findings of any GWAS study.

Neale *et al* (2008), carried out the first GWAS on ADHD in 909 affected triads and identified nominal associations for *XKR4* and *FAM190A*, two genes expressed in the cerebellum. A second family-based multi-site GWAS comprised of 735 affected-offspring trios highlighted the *SLC9A9* gene (Mick *et al*, 2010). Four additional case-control GWAS were also conducted in childhood ADHD and unscreened controls. Neale *et al*, genotyped 896 cases and 2455 controls and found *CDH13* and *PRKG1* among the top-ranked genes nominally associated with ADHD, while the other three studies yielded no significant evidence of association neither in the discovery cohort nor in the replication attempts on different datasets (Hinney *et al*, 2011; Neale *et al*, 2010a; Stergiakouli *et al*, 2012; Yang *et al*, 2013). Finally, a single GWAS analysis has been reported on persistent ADHD. It used a DNA-pooling strategy in a sample of 343 adults with ADHD and 304 controls in conjunction with linkage analysis and pointed to several chromosomal regions likely to contain allelic variants influencing susceptibility to ADHD (Lesch *et al*, 2008). So far, following the first analysis by Neale *et al*, secondary analyses considering the same dataset were conducted on ADHD-related phenotypes, such as quantitative measures of DSM-IV ADHD symptoms, age at onset of ADHD symptoms, or conduct problems. None of them identified single-nucleotide polymorphisms (SNPs) achieving genome-wide significance, with the most significant markers located in *CDH13* and *GFOD1* (Lasky-Su *et al*, 2008a; Lasky-Su *et al*,

2008b). All these negative results suggest that an even larger sample may be required, in analogy to approaches in schizophrenia and bipolar disorder where larger sample size did result in significant findings (Ripke *et al*, 2013a; Ruderfer *et al*, 2013). However, the first large-scale meta-analysis of ADHD GWAS datasets in 2064 trios, 896 cases, and 2455 controls from four previous studies also failed to identify any genome-wide significant association with childhood ADHD (Neale *et al*, 2010b).

In an attempt to unravel novel genes and biological pathways related to ADHD, we aimed to improve the design of previous GWAS in ADHD through reducing heterogeneity in the discovery cohort by (1) considering persistent ADHD, which may be influenced by a stronger genetic load than remitting ADHD (Biederman *et al*, 1996; Chang *et al*, 2013; Faraone *et al*, 2000a); (2) recruiting patients from a restricted geographic area by a single clinical group and following a single assessment protocol, which may facilitate the identification of risk variants that might be neglected by a broader recruitment approach used in previous multi-site GWAS; (3) not only considering the overall ADHD sample, but also the combined and inattentive clinical subtypes that may be influenced by shared as well as specific genetic factors; and (4) using screened, non-ADHD controls. Following this strategy we conducted a two-stage case-control GWAS in adulthood ADHD. The first phase included a discovery cohort of 607 adults with ADHD and 584 controls from Spain. Top signals were subsequently tested for replication in three independent follow-up cohorts including 2104 adults with ADHD and 1901 controls from three European countries (Germany, The Netherlands, and Norway) integrated in The International Multicentre persistent ADHD CollaboraTion (IMpACT).

MATERIALS AND METHODS

Participants

Clinical information of the studied cohorts is included in Supplementary Table S1 and Supplementary Material. Briefly, the discovery cohort consisted of 607 adulthood ADHD cases (61% combined, 35% inattentive, 3.5% hyperactive-impulsive and 0.5% with undefined subtype) and 584 healthy controls from Spain. All patients were adults of Caucasian origin and met Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders-IV (DSM-IV) criteria for ADHD. The diagnosis of ADHD was evaluated with the Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I and II Disorders (SCID-I and SCID-II) and the Conner's Adult ADHD Diagnostic Interview for DSM-IV (CAADID Parts I and II). For the replication study, 2104 adult ADHD patients and 1901 controls of Caucasian origin from three European countries (Germany, The Netherlands and Norway; for more information see Sánchez-Mora *et al*, 2010) were recruited at three sites of the IMpACT (Supplementary Table S1). Consensus eligibility criteria for the current study across all sites were a diagnosis of ADHD according to the diagnostic criteria of DSM-IV, onset before the age of 7 years via retrospective diagnosis (which was confirmed by a family member, wherever possible), lifelong persistence, and current diagnosis. The study was approved by the ethics committee of each institution and informed consent was

obtained from all participants in accordance with the Declaration of Helsinki.

Study Design, Genotyping, and Quality Control Assessment

To identify loci conferring susceptibility to ADHD, we carried out a two-stage case-control GWAS. In the initial discovery phase we performed genome-wide genotyping with the Illumina HumanOmni1-Quad BeadChip platform in 607 adults with ADHD and 584 healthy controls. Quality control was implemented at the individual and SNP level using PLINK (Purcell *et al*, 2007) and included filtering subjects with low call rate (<98%) or gender discrepancy followed by filtering SNPs with minor allele frequency (MAF) <0.01, Hardy-Weinberg equilibrium test *P*-values, PHWE <1e-06 or call rate <0.99 in either cases or controls. Top signals were further evaluated in three independent follow-up cohorts from Germany, The Netherlands, and Norway consisting of 2104 cases and 1901 controls. The replication cohorts were genotyped using the Competitive Allele Specific PCR (KASP) technology (LGC Genomics, UK). Clinical information of the studied cohorts is included in Supplementary Table S1 and Supplementary Material.

Statistical Analysis

Genome-wide association study. Initially, 607 cases and 584 controls were genotyped for 1 138 747 markers. In total, five samples were excluded from the analysis due to low call rate. After stringent quality control assessment, a total of 794 090 SNPs with a mean call rate of 0.9994 for the remaining 603 cases and 583 controls were included in the study. Genome-wide association analysis was performed using the Cochran-Armitage trend test with PLINK. The genomic inflation factor (λ) was calculated and used to correct for the degree of inflations. Quantile-quantile and Manhattan plots were drawn using the SnpStats (Clayton, 2013) and Gap R packages (Zhao, 2013). The genome-wide significance threshold was calculated by considering the three ADHD clinical subtypes and was set at $P < 1.7e - 08$ ($5e - 08/3$). The phenotypic variance explained by all autosomal SNPs for ADHD was calculated with GCTA software (Yang *et al*, 2013). The gene-based association analysis was performed with the VEGAS software following the default settings and considering the HaMap CEU samples to estimate the linkage disequilibrium (LD) structure (Liu *et al*, 2010). The ALIGATOR software was used to test for over-representation of biological pathways, as indexed by gene ontology (GO) terms, considering genes (RefSeq transcript plus 20 kb up and downstream) with at least one SNP showing $P < 0.05$, 10 000 replicate gene lists and 10 000 replicate studies (Holmans *et al*, 2009). ALIGATOR corrects for variable gene size, for the presence of LD between SNPs and for overlapping genes through a random selection of SNPs for generation of replication gene lists that are used to calculate the category-specific *P*-value. The replicate studies are used to assess significance of the numbers of categories reaching various *P*-values and the study-wide significance levels for individual categories.

Follow-up of top signals from the discovery stage. For the replication analysis, a follow-up threshold of significance was set at $PGC < 1e - 05$. A total of 16 independent SNPs reaching this cut-off were considered (Supplementary Table S1 and S2). For the SNP selection we evaluated the LD pattern of markers achieving the follow-up threshold with the LD-select software ($r^2 < 0.85$; Carlson *et al*, 2004). Seven markers were selected for replication in the overall ADHD sample, eight in the combined and four in the inattentive clinical subtypes (Supplementary Table S2). Rs1937444 could not be tested due to experimental constraints and therefore 15 SNPs from 10 loci were finally assessed (Supplementary Table S2). We performed a single-marker analysis on the replication samples from the three IMpACT sites separately and then combined the individual study results using both mega-analytic and meta-analytic approaches. We assessed HWE in each control sample and compared genotype frequencies using Cochran-Armitage trend tests with the SNPassoc R package (González *et al*, 2007). Meta-analyses were conducted using the Meta-R package, under a dominant model of inheritance (Viechtbauer, 2010). To test heterogeneity among studies we used the Q-statistic and heterogeneity, which was considered significant when $P_Q < 0.10$. When no heterogeneity was present, the pooled OR was estimated using a fixed-effects model. Otherwise, a random-effects model was applied. Under the more conservative Bonferroni correction taking into account 15 SNPs and three clinical subtypes, the threshold for significance was set at $P < 1.1e - 03$ ($0.05/15 \times 3$).

Imputation and gene-based association analysis. Markers at the *FBXO33* (*F-box only protein 33* gene) locus (ch14:39865674-39902852) were imputed in the discovery sample with the BEAGLE software using data from the 1000 Genomes Project (<http://www.1000genomes.org/>; Browning and Browning, 2009). The association analysis was performed using the Cochran-Armitage trend test with PLINK (Purcell *et al*, 2007). The significance threshold under the Bonferroni correction was set at $P < 4.7e - 04$, considering the 107 SNPs analyzed in the *FBXO33* locus. The prediction of the potential effects of the risk alleles associated with ADHD were tested using CFSSP (Chou & Fasman Secondary Structure Prediction Server), SNPinfo, TFSearch, ESEfinder, ESRSearch, and RESCUE_ESE (Chou and Fasman, 1974; Cartegni *et al*, 2003; Fairbrother *et al*, 2002; Heinemeyer *et al*, 1998; Wang *et al*, 2004; Xu and Taylor, 2009) as well as the Ensembl database (<http://www.ensembl.org/>).

Cis Expression Quantitative Trait Loci Analysis

FBXO33 expression levels and genotype data for rs17696574, rs10139591, rs7156962, and rs1056345 from 210 unrelated HapMap individuals, including Utah residents with Northern and Western European ancestry from the CEPH collection (CEU, $n = 60$); Han Chinese from Beijing, China (CHB, $n = 45$); Japanese from Tokyo, Japan (JPT, $n = 45$); and Yoruban from Ibadan, Nigeria (YRI, $n = 60$), were obtained from the whole-genome Illumina lymphoblastoid cell line gene expression data and the HapMap browser (<http://www.hapmap.org/>) (International HapMap Consortium (2003)), respectively. No genotype data were available for marker rs12232110. For the expression data we

considered the GSE6536 series dataset at the Gene Expression Omnibus site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>; Stranger *et al*, 2007a; Stranger *et al*, 2007b) and selected the GI_42558257-S probe corresponding to the *FBXO33* transcript NM_203301.3. Association tests between genetic markers and *FBXO33* expression were performed using linear regression models with SPSS 17.0 (SPSS, Chicago, USA) and the significant threshold was set at 0.0125 (0.05/4 SNPs) after applying the Bonferroni correction.

Brain Imaging Studies

To further understand the effects of ADHD-related SNPs in *FBXO33*, we tested rs17696574, rs12232110, rs10139591, rs7156962, and rs1056345 for their effects on brain structure in a pre-existing neuroimaging genetics sample, consisting of 1300 adult subjects (age range 18–40 years, average age 22.9 years) from the Dutch Cognomics Resource Brain Imaging Genetics (BIG; www.cognomics.nl). All participants were self-reportedly healthy subjects of Caucasian descent with no ADHD diagnosis. Genetic data were available from an Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 and imputed using the 1000 Genomes reference set. The effects of the genetic variation on structural brain changes were tested using voxel-based morphometry (VBM). For this, structural T1 brain scans acquired at 1.5 and 3 Tesla scanners (Siemens, Erlangen, Germany) were used (Supplementary Material). To study the effects of the specific SNPs, a full-factorial ANCOVA was performed using genotype as factor and age, gender, total brain volume, and field strength of the scanner as covariates. Gray and white matter images were analyzed separately. Statistics were corrected for non-stationarity and were applied at $P_{\text{uncorrected}} < 1e - 04$. Significant clusters were considered at a level of $P_{\text{FWE}} < 0.05$. We specified our regions of interest using the WFU pickatlas (Maldjian *et al*, 2003). These regions included the frontal lobe, caudate nucleus, and the cerebellum selected based on information on *FBXO33* gene expression in combination with knowledge of brain regions implicated in ADHD (Cubillo and Rubia, 2010).

RESULTS

Genome-Wide Association Study

In the first stage of the study and after individual and SNP-based standard quality control filtering, we conducted a GWAS in a discovery sample of 603 adult ADHD cases and 583 healthy controls. The quantile–quantile plot showed no departure from the expected *P*-values distribution with a genomic control inflation factor $\lambda = 1.031$ used as a final quality control measure (Supplementary Figure S1). None of the association signals exceeded genome-wide thresholds for significance ($P_{\text{GC}} < 1.7e - 08$). The GWAS of the overall sample, however, highlighted 12 SNPs from five loci that surpassed the follow-up threshold ($P_{\text{GC}} < 1e - 05$), five of which were located in four genes, *PEX19* (rs10594, $P_{\text{GC}} = 3.69e - 06$), *COPA* (rs7522166, $P_{\text{GC}} = 1.97e - 06$ and rs6669995, $P_{\text{GC}} = 6.43e - 06$), *FBXO33* (rs12590172, $P_{\text{GC}} = 7.40e - 06$), and *KCNGB4* (rs11646443, $P_{\text{GC}} = 6.51e - 07$; Table 1; Supplementary Figure S2). When patients were subdivided according to clinical subtype, we identified eight

Table 1 Case–Control Genome-Wide Association Study in 603 Adult ADHD Patients and 583 Sex-Matched Unrelated Controls: Top Hits

SNP	Chr	Base pairs ^a	Nearest gene	Risk allele ^b	Cases				Controls				Sum	Adjusted <i>P</i> ^c	Adjusted <i>P</i> ^c Combined	Adjusted <i>P</i> ^c Inattentive
					II	I2	22	Sum	II	I2	22	Sum				
rs157524	1	160246485		T	218 (362)	300 (498)	85 (14.1)	603	148 (25.4)	306 (52.3)	129 (22.1)	583	3.55e-06	2.49e-04	3.64e-04	
rs10594 ^d	1	160247185	PEX19 ^e (3'UTR)	G	218 (362)	300 (498)	85 (14.1)	603	147 (25.3)	305 (52.6)	128 (22.1)	580	3.69e-06	2.54e-04	3.67e-04	
rs2795069	1	160256405		G	218 (362)	299 (496)	86 (14.3)	603	148 (25.4)	306 (52.3)	129 (22.1)	583	4.44e-06	3.08e-04	3.77e-04	
rs7522166	1	160276709	COPA ^e	C	220 (365)	298 (494)	85 (14.1)	603	147 (25.2)	307 (52.7)	129 (22.1)	583	1.97e-06	1.71e-04	2.33e-04	
rs6669995	1	160297924	COPA ^e	T	218 (362)	300 (498)	85 (14.1)	603	150 (25.7)	305 (52.3)	128 (22.0)	583	6.43e-06	3.83e-04	5.18e-04	
rs1445594 ^d	13	58675299	PCDH17	A	363 (602)	218 (362)	22 (3.6)	603	283 (48.5)	252 (43.2)	48 (8.2)	583	5.61e-06	4.70e-05	0.0017	
rs1897792 ^d	14	39697568		A	311 (517)	244 (405)	47 (7.8)	602	366 (62.9)	197 (33.8)	19 (3.3)	582	8.82e-06	2.00e-05	0.0013	
rs4902569 ^d	14	39858941		G	275 (456)	254 (42.1)	74 (12.3)	603	326 (56.0)	223 (38.3)	33 (5.7)	583	9.47e-06	7.54e-06	0.0022	
rs2415545 ^d	14	39863802		A	165 (274)	293 (486)	145 (24.0)	603	218 (37.4)	277 (47.5)	88 (15.1)	583	5.73e-06	2.72e-06	0.0071	
rs12590172	14	39893535	FBXO33 ^e	C	278 (46.1)	255 (42.3)	70 (11.6)	603	329 (56.4)	225 (38.6)	29 (5.0)	583	7.40e-06	3.96e-06	0.0031	
rs11644983 ^d	16	80314901	DDY1LRB2	C	543 (900)	59 (9.8)	1 (0.2)	603	472 (81.0)	107 (18.4)	4 (0.7)	583	9.11e-06	6.58e-05	0.0057	
rs11646443 ^d	16	84270476	KCNGB4 ^e (EXON 1)	G	318 (52.7)	249 (41.3)	36 (6.0)	603	228 (39.1)	291 (49.9)	64 (11.0)	583	6.51e-07	8.39e-07	0.0055	

^aBase pairs according to hg19—NCBI build 36.

^bPositive strand.

^cCochran–Armitage trend test *P*-values deflated for a genomic control inflation factor $\lambda = 1.031$.

^dSNP selected for follow-up.

^eSNP within the gene.

loci in which one or more SNPs showed evidence for association with combined or inattentive ADHD subtypes after considering the cut-off of $P_{GC} < 1e-05$, with the top signal at rs2232429 ($PGC = 8.88e-08$; Tables 2 and 3; Supplementary Figure S2). Six of them were located in five genes: *ZSCAN12* (rs2232429, $PGC = 8.88e-08$), *FBXO33* (rs3814860, $P_{GC} = 8.72e-06$ and rs12590172, $P_{GC} = 3.96e-06$), *KCNGB4* (rs11646443, $P_{GC} = 8.39e-07$), *PDE4B* (rs1937444, $P_{GC} = 7.12e-06$), and *ACCN1* (rs1988353, $P_{GC} = 1.16e-06$; Tables 2 and 3; Supplementary Figure S2). The proportion of variance for ADHD explained by the 794090 autosomal SNPs was estimated at 0.25 (SE = 0.01; $P = 1.2e-08$), 0.24 (SE = 0.011; $P = 6.6e-06$), and 0.19 (SE = 0.07; $P = 2.9e-05$) for overall, combined, and inattentive ADHD, respectively.

Follow-up of Top Signals from the Discovery Stage

Fifteen SNPs from 10 loci with a significance level of $PGC < 1e-05$ in the discovery sample were taken forward for follow-up in three independent clinic-based adult ADHD samples (2104 cases and 1901 controls). Although nominal associations were detected in some of the populations under study (Supplementary Table S3–S4), no significant differences were observed in the joint analysis of the three replication cohorts neither through a mega-analysis (Supplementary Table S3–S4) nor in a meta-analysis (data not shown).

We subsequently considered the available data from both the discovery and replication stages and, although none of the markers surpassed genome-wide significance, some remained nominally associated with ADHD. When the overall ADHD sample was considered in the pooled analysis, six out of seven SNPs were nominally associated with ADHD: rs10594 ($P = 8.4e-04$), rs11644983 ($P = 6.6e-04$), rs2415545 ($P = 9.7e-03$), rs4902569 ($P = 0.014$), rs11646443 ($P = 0.049$), and rs1897792 ($P = 0-05$; Supplementary Table S3). Rs10594 and rs11644983 showed a significant association with ADHD in the German or Norwegian samples, respectively, with consistent effect size for the same risk allele identified in the discovery sample. When patients were subdivided according to the ADHD subtypes, the five SNPs tested at the *FBXO33* locus remained associated with combined ADHD, rs4902569 ($P = 5.9e-03$), rs2415543 ($P = 6.4e-03$), rs2415545 ($P = 3.0e-03$), rs3814860 ($P = 2.5e-03$), and rs17696574 ($P = 3.1e-03$; Supplementary Table S4a). Positive signals were also observed for the three SNPs considered in the inattentive ADHD sample, rs12333188 ($P = 3.0e-04$), rs1962749 ($P = 2.1e-04$), and rs1988353 ($P = 2.3e-04$; Supplementary Table S4b). The mega-analysis, however, showed less significant results for all SNPs than the analysis of the discovery sample.

We subsequently performed a meta-analysis considering the discovery and replication sample sets and, after having detected heterogeneity among populations, a single positive signal was identified at rs17696574, located 5' from *FBXO33*, in the combined ADHD clinical subtype ($OR_{random} = 1.34$ (1.01–1.78); $P = 0.041$; Table 4 and Supplementary Tables S5–S7). Although the same analysis in the replication cohorts alone showed borderline significant association (combined ADHD: $OR_{random} = 1.20$ (0.99–1.46), $P = 0.056$;

Table 2 Case–Control Genome-Wide Association Study in 368 Adult Combined ADHD Patients and 583 Sex-Matched Unrelated Controls: Top Hits

SNP	Chr	Base pairs ^a	Nearest gene	Risk allele ^b	Cases			Controls			Sum	Adjusted P^c	Adjusted P^c All	Adjusted P^c Inattentive	
					11	12	22	Sum	11	12					22
rs2232429 ^d	6	28 359 632	ZSCAN12 ^e	G	303 (82.6)	50 (13.6)	14 (3.8)	367	540 (92.6)	42 (7.2)	1 (0.2)	583	8.88e-08	6.13e-05	0.66
rs4416909 ^d	9	24 095 294	ELAVL2	C	131 (35.6)	173 (47.0)	64 (17.4)	368	137 (23.5)	289 (49.6)	157 (26.9)	583	7.65e-06	4.64e-05	0.084
rs4902569 ^d	14	39 858 941		G	159 (43.2)	164 (44.6)	45 (12.2)	368	326 (56.0)	223 (38.3)	33 (5.7)	582	7.54e-06	9.47e-06	0.0023
rs2415543 ^d	14	39 860 216		A	113 (30.7)	191 (51.9)	64 (17.4)	368	265 (45.5)	250 (42.9)	68 (11.7)	583	9.80e-06	2.86e-05	0.012
rs2415545 ^d	14	39 863 802		A	86 (23.4)	197 (53.5)	85 (23.1)	368	218 (37.4)	277 (47.5)	88 (15.1)	583	2.72e-06	5.73e-06	0.0071
rs3814860 ^d	14	39 868 646	FBXO33 (3'UTR) ^e	A	163 (44.3)	163 (44.3)	42 (11.4)	368	331 (56.8)	223 (38.3)	29 (5.0)	583	8.72e-06	1.16e-05	0.0029
rs12590172	14	39 893 535	FBXO33 ^e	C	160 (43.5)	165 (44.8)	43 (11.7)	368	329 (56.4)	225 (38.6)	29 (5.0)	583	3.96e-06	7.40e-06	0.0031
rs17696574 ^d	14	39 967 531		G	173 (48.1)	155 (43.1)	32 (8.9)	360	200 (34.4)	286 (49.1)	96 (16.5)	582	4.40e-06	1.03e-05	0.015
rs11646443 ^d	16	84 270 476	KCNGB4 ^e (EXON 1)	G	203 (55.2)	144 (39.1)	21 (5.7)	368	228 (39.1)	291 (49.9)	64 (11.0)	583	8.39e-07	6.51e-07	0.0055

^aBase pairs according to hg19—NCBI build 36.

^bPositive strand.

^cCochran–Armitage trend test P -values deflated for a genomic control inflation factor $\lambda = 1.0307$.

^dSNP selected for follow-up.

^eSNP within the gene.

Table 3 Case-Control Association Study in 211 Adult Inattentive ADHD Patients and 583 Sex-Matched Unrelated Controls: Top Hits

SNP	Chr	Base pairs ^a	Nearest gene	Risk allele ^b	Cases N (%)				Controls N (%)				Adjusted P ^c All	Adjusted P ^c Combined	
					II	I2	22	Sum	II	I2	22	Sum			
rs1937444 ^d	1	66 463 920	PDE4B ^e	A	94 (44.5)	98 (46.4)	19 (9.0)	211	359 (61.6)	200 (34.3)	24 (4.1)	583	7.12e-06	0.0013	0.18
rs12333188 ^f	6	143 065 590	GPR126	T	188 (89.1)	23 (10.9)	—	211	566 (97.1)	17 (2.9)	—	583	7.63e-06	0.0013	0.090
rs1962749 ^f	6	153 551 654		A	146 (69.2)	59 (28.0)	6 (2.8)	205	483 (82.8)	97 (16.6)	3 (0.5)	580	8.56e-06	0.015	0.763
rs1988353 ^f	17	1 468 941	ACCN1 ^e	A	97 (46.0)	90 (42.7)	24 (11.4)	211	362 (62.1)	200 (34.3)	21 (3.6)	583	1.16e-06	0.011	0.93

^aBase pairs according to hg19—NCBI build 36.^bPositive strand.^cCochran–Armitage trend test *P*-values deflated for a genomic control inflation factor $\lambda = 1.0307$.^dNot tested in the replication phase due to experimental constraints.^eSNP within the gene.^fSNP selected for follow-up.

Table 4b), directionally consistent effects were observed in the populations under study and these differences remained significant when we considered the overall ADHD cohort ($OR_{\text{fixed}} = 1.24$ (1.06–1.44; $P = 5.7e - 03$).

To better delineate the involvement of *FBXO33* in combined ADHD and to detect potential functional variants, we imputed markers at this locus in the discovery cohort. Although the locus imputation did not identify any genome-wide significant signal, imputed SNPs within the locus provided stronger evidence for association than genotyped SNPs (Figure 1; Supplementary Table S8). Positive signals were identified along the entire gene, with the top signal, rs12232110 ($P = 9.02e - 07$), located in intron 1 (Supplementary Table S8). Although conditioning for the effect of rs12232110 eliminated evidence for association for the majority of SNPs in close proximity, this marker did not explain the entire signal at *FBXO33* since a second independent SNP, rs10139591, maintained significance with combined ADHD ($P = 4.7e - 04$). This second marker is also located in intron 1, lies 1.5 kb from rs12232110 and resides in a haplotype block that encompasses the entire *FBXO33* gene (Figure 1). Other candidate SNPs within the region were also nominally associated with combined ADHD when conditioning for the effect of rs12232110 and include rs7156962 ($P = 0.05$) and rs1056345 ($P = 3.1e - 03$) in exons 3 and 4 of the *FBXO33* gene, respectively. Given that multiple SNPs mapped to *FBXO33*, we performed a gene-wise association test based on all the SNPs in the gene ($n = 17$) and found additional evidence for its involvement in ADHD (gene-based *P*-value = $1e - 06$ for overall and combined ADHD). Since *FBXO33* acts as a substrate-recognition component of a protein-ubiquitin ligase complex, we also examined the joint effect of genetic variation in biological pathways. After quality control procedures, genotypes on 750 222 SNPs were considered, of which 443 335 lay within genes, covering 22 947 genes and 6188 categories. The pathway analysis showed a total of 293 out of 5264 GO categories reaching nominal significance for over-representation in our GWAS dataset. Among them, significant results were observed for the gene set/pathway referenced as ‘protein ubiquitination’ (GO:0016567), which includes the *FBXO33* gene ($P = 0.016$; 41 significant genes out of 81 genes in this GO category), and for 31 additional GO categories related to neuronal development, differentiation, and activity (Supplementary Table S9). When the *FBXO33* gene was excluded from the pathway analysis, the ‘protein ubiquitination’ category remained significantly over-represented in our GWAS dataset ($P = 0.026$).

To provide insight into the molecular mechanisms behind the top *FBXO33* SNPs associated with ADHD, we searched for cis eQTLs (expression quantitative trait loci) using a pre-existing dataset (GSE6536; Stranger *et al*, 2007a; Stranger *et al*, 2007b) and performed neuroimaging genetics studies using VBM analyses. In total, five SNPs within the *FBXO33* locus were considered: rs17696574, identified in the joint meta-analysis of the discovery and the replication samples, rs12232110 and rs10139591, the two independent top signals identified in the discovery sample after genotype imputation, and rs7156962 and rs1056345, two intragenic SNPs nominally associated with ADHD that were located in exons 3 and 4 of the *FBXO33* gene, respectively. *FBXO33* expression levels in HapMap lymphoblastoid cell lines were

Table 4 Effect of rs17696574 on combined ADHD considering (a) the discovery and replication cohorts or (b) the replication cohorts alone

Study	ADHD		Controls		OR	OR	95% (CI)	Weith _{Fixed} (%)	Weith _{Random} (%)	Z	P-value
	GG+GA	Total	GG+GA	Total							
a											
Discovery	328	360	486	582		2.02	1.33; 3.09	14.6	21.7		
Germany	748	873	603	718		1.14	0.87; 1.50	41.9	30.4		
Netherlands	192	227	520	613		0.98	0.64; 1.50	19.2	21.8		
Norway	289	347	428	556		1.49	1.06; 2.10	24.3	26.1		
Fixed effect model		1807		2469		1.32	1.11; 1.58	100	–	3.18	0.0015
Random effects model						1.34	1.01; 1.78	–	100	2.04	0.041
Heterogeneity: I-squared = 59.3%, tau-squared = 0.0485, P = 0.0611											
0.5 1 2											
b											
Germany	748	873	603	718		1.14	0.87; 1.50	49.1	45.0		
Netherlands	192	227	520	613		0.98	0.64; 1.50	22.4	22.9		
Norway	289	347	428	556		1.49	1.06; 2.10	28.5	32.1		
Fixed effect model		1447		1887		1.20	0.99; 1.46	100	–	1.91	0.056
Random effects model						1.20	0.97; 1.49	–	100	1.64	0.10
Heterogeneity: I-squared = 20.7%, tau-squared = 0.008, P = 0.2834											
0.5 1 2											

Data in bold correspond to the summary statistics of the meta-analysis.

significantly associated with genotypes in a dose-dependent manner for rs17696574 and rs7156962 (eQTL $P = 0.024$ and $P = 8.7e - 03$, respectively), with lower *FBXO33* expression being associated with the rs17696574G and rs7156962C risk alleles (Supplementary Figure S3). After applying the Bonferroni correction, only rs7156962 remained associated with *FBXO33* expression levels.

When we investigated the role of *FBXO33* SNPs in the brain considering the frontal lobe, caudate nucleus and the cerebellum as regions of interest, we found a nominally significant effect of rs1056345 (AA ($n = 406$)/TA ($n = 603$)/TT ($n = 211$)) on frontal gray matter (peak voxel $x = -56$, $y = -8$ and $z = 49$; cluster $P_{FWE} = 0.02$), with *FBXO33* risk genotypes being nominally associated with reduced gray matter volume (Supplementary Figure S4). This effect was observed on the border of the frontal lobe and the parietal lobe, covering parts of the left post-central gyrus, an area that is involved in motor processing, which is a deficient cognitive domain in ADHD (Stray et al, 2013). No significant effects were found for the other SNPs or brain regions.

DISCUSSION

We have completed a genome-wide association scan and a follow-up replication study on adult ADHD. To our knowledge, this is the first GWAS on the persistent form of the disorder following individual genotyping, since the only one reported so far used DNA pooling (Lesch et al, 2008). Our results show that common SNPs in total explain 0.25 (SE = 0.01) of phenotypic variance for adulthood ADHD, similar to the 0.28 (SE = 0.02) described in a previous study of childhood ADHD (Lee et al, 2013). Although none of the findings exceeded genome-wide thresholds for association,

neither in the discovery cohort nor in the follow-up meta-analysis, the results of the present study show tentative evidence for the involvement of the *FBXO33* gene in the susceptibility to adult ADHD.

FBXO33 is a member of the F-box protein family that acts as a substrate-recognition component of a protein-ubiquitin ligase complex involved in targeting substrates for proteasomal degradation. *FBXO33* has embryonic and adulthood expression in a wide range of neural tissues and has previously been associated with autism spectrum disorders in two large cohorts and with the neural response to seizure (Flood et al, 2004; Tai and Schuman, 2008; Wang et al, 2009). In addition, a deletion of chromosome 14 that spans the *FBXO33* gene was identified in a patient with signs of attention deficit, hyperactivity, and mild mental retardation (de Bruijn et al, 2010). Furthermore, a balanced t(14;21)(q21.1;p11.2) translocation involving the *FBXO33* gene was also reported in a patient with severe progressive autism (de Bruijn et al, 2010). These results are in agreement with previous studies pointing to a shared genetic etiology between ADHD and autism and support the view that common risk factors may be involved in both disorders as well as in their comorbidity (Nijmeijer et al, 2010; Rommelse et al, 2010).

To our knowledge, this is the first study suggesting a role of the ubiquitination machinery in ADHD, which is in line with previous reports showing association between genes from the ubiquitin family and autism, bipolar disorder, or intellectual disability (Glessner et al, 2009; Ryan et al, 2006; Tai and Schuman, 2008). Although the ubiquitin-proteasome pathway modulates synaptic activity, neurotransmitter release, and synaptic vesicle recycling, the exact mechanism by which *FBXO33* contributes to ADHD remains to be elucidated. Our expression study suggests that decreased *FBXO33* levels may underline the vulnerability to

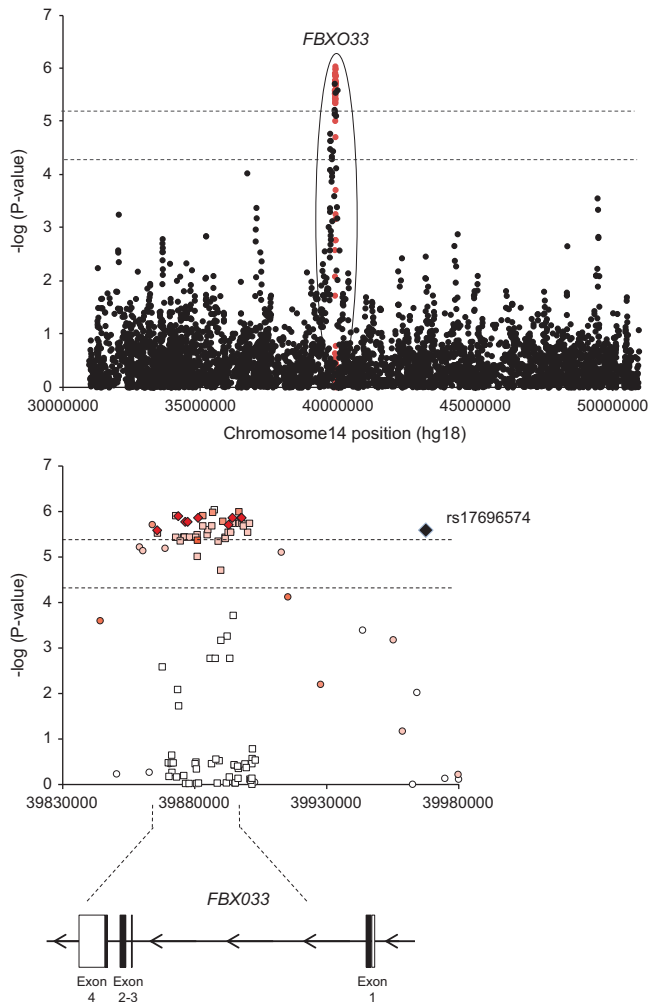


Figure 1 Regional association plot including the *FBXO33* locus on chromosome 14q13.3 from data imputed using the 1000 Genomes Project dataset. The x-axis shows physical distance (kb) and y-axis shows $-\log(P)$ values when considering the combined ADHD discovery cohort. In the upper panel genotyped and imputed markers are indicated in black and red dots, respectively. In the lower panel, the color reflects the degree of linkage disequilibrium (r^2) between each genotyped (circled) or imputed (squared) marker with the most associated genotyped SNP, rs17696574, shown in diamond.

ADHD, which is in agreement with the downregulation of ubiquitin cycle-related genes identified in bipolar post-mortem brains (Ryan *et al*, 2006). Reduced expression of enzymes involved in this pathway may thus impair targeting of proteins for proteasomal degradation and hence the turnover of synaptic components. The association between the *FBXO33* risk variant at the 3'UTR of the gene and reduced gray matter volume in the left post-central gyrus, a region that is part of the attention network of the brain and shows altered activity in patients with combined subtype ADHD (Silk *et al*, 2005), also supports the role of *FBXO33* in the pathogenesis of ADHD. Further studies are needed to confirm whether *FBXO33* expression is involved in ADHD and to determine the potential mechanism by which reduced expression of this gene may contribute to the susceptibility to the disorder.

Although the top SNP from this association study, rs17696574, is located 65.8 kb upstream from *FBXO33*, its

involvement in ADHD is supported by multiple highly correlated SNPs within the gene region as well as by the gene-wise association analysis (Figure 1). Interestingly, rs7156962, an evolutionary conserved synonymous change in exon 3 of *FBXO33*, may affect the regulation of splicing, with the rs7156962C risk allele altering putative exonic splicing enhancers. This sequence variant has a functional significance score (FS) of 0.77, which may reflect its potential deleterious effect (Lee and Shatkay, 2009). Other SNPs within the *FBXO33* locus highlighted in the present study may also deserve further attention, since they are highly conserved (rs3814860), affect highly methylated regions (rs12232110), or alter transcription factor binding sites (TFBS; rs2415543). In addition, all these sequence variants, with the exception of rs2415543, are associated with trimethylated histone H3 at lysine 36 (H3K36me3), which is related with transcriptionally active regions. Finally, the correlation between genotypes at rs17696574 or rs7156962, a synonymous change in exon 3, and *FBXO33* expression levels in lymphoblastoid cell lines also suggests functional relevance and reinforces the possibility of true causality. In any case, the analysis of gene expression in brain tissue is required to confirm this correlation.

Given that the two top-ranked SNPs associated with ADHD after locus imputation, rs12232110 and rs10139591, are located in intron 1 of *FBXO33* and contained in a LD block that spans the entire gene (Figure 1), we cannot rule out that additional coding variants in *FBXO33* might exert functional effects. It also remains an open issue whether disease vulnerability is driven by a single variant or by multiple independent SNPs within the region. Further fine mapping and deep sequencing of this genomic region is required to identify causal sequence variants directly involved in the genetic background of ADHD.

Although we have attempted to minimize limitations of previous GWAS, the outcome of the present study should be interpreted in the context of several considerations.

First, to minimize population stratification and genetic heterogeneity we focused on the persistent form of ADHD. Despite the fact that genetic studies have mainly focused on children, there is evidence pointing to the existence of an even stronger genetic component in adult ADHD (Biederman, 2005; Biederman and Faraone, 2005; Chang *et al*, 2013; Faraone *et al*, 2005). In addition, different lines of investigation suggest a distinct genetic load between persistent and remitting ADHD, and support the existence of specific genetic factors contributing to the stability of ADHD symptoms across life (Kuntsi *et al*, 2005; Price *et al*, 2005; Ribases *et al*, 2008). Thus, previous GWAS focused on childhood ADHD may have increased heterogeneity by including in the analysis the subset of patients in whom ADHD will remit.

Second, nominal signals were detected both in the discovery cohort and in the joint analysis of the discovery and replication samples, but only borderline significance was observed when the replication cohorts were considered alone. Although this is not a standard replication-based design, the analysis combining the information from both the discovery and replication samples may be more powerful than treating the design as a hypothesis generation followed by independent replication (Skol *et al*, 2006). Further studies in additional samples and a truly independent replication

are warranted both to confirm the association between *FBXO33* and ADHD and to estimate the magnitude of its effect.

Third, a part from variation in *FBXO33*, we failed to replicate in our validation cohort any of the top-ranked associations that achieved the follow-up threshold of significance in the discovery stage. Although these results provide little support for association with genes other than *FBXO33*, several top findings deserve further comments. *PEX19* and *COPA* encode the peroxisomal farnesylated protein and the subunit alpha of the coatomer protein complex, respectively, and they have been associated with different psychiatric disorders. *PEX19* was associated with major depression in a meta-analysis carried out by the Psychiatric GWAS Consortium (Ripke et al, 2013b), while *COPA* expression has been found dysregulated in the orbitofrontal cortex of bipolar disorder patients (Ryan et al, 2006). In addition, *KCNQ4* codes for a regulatory subunit of voltage-gated potassium channels highly expressed in the brain, involved in the regulation of neurotransmitter release and neuronal excitability, and associated with migraine (Lafreniere and Rouleau, 2012). Interestingly, although rs11646443, the missense change (c.616G>A, p.Arg206Trp) in *KCNQ4* found associated with ADHD in the present study may not change the secondary structure of the protein or have damaging effects on its function, it might affect the regulation of splicing, since the rs11646443G risk allele lies within a putative exonic splicing repressor. Finally, *PCDH17* belongs to the protocadherin family and its product participates in synaptic function and cell-cell adhesion activity, which has been previously associated with ADHD (Lesch et al, 2008; Neale et al, 2008; Neale et al, 2010b; Rivero et al, 2013; Zhou et al, 2008). These promising candidates may be considered as potential ADHD-related loci worth replicating in larger sample sets.

In addition, the results from our GWAS do not identify hits from previous GWAS or provide genome-wide significant support for any of the previously postulated candidate genes for ADHD (Franke et al, 2009; Hinney et al, 2011; Lesch et al, 2008; Mick et al, 2010; Neale et al, 2008; Stergiakouli et al, 2012). No overlap or LD was observed between our main hits and the top-ranked findings from previous GWAS reports either. Confounding factors, such as comorbidities, IQ, or environmental influences that may modulate the genetic mechanisms predisposing to ADHD could help to explain that positive signals in previous studies do not reach genome-wide significance in our study or were not ranked high enough to be included in our replication stage. It is worth pointing out, however, that rs1937444 in the *PDE4B* gene showed a borderline significant association with adulthood ADHD in a previous GWAS performed in the persistent form of the disorder (Supplementary Table S10; Lesch et al, 2008). Interestingly, this gene was previously associated with schizophrenia (Millar et al, 2005) and an identically active isoform, the brain-specific phosphodiesterase 4D isoform 6 (PDE4D6), was found duplicated in an ADHD family (Lesch et al, 2011).

Fourth, we aimed to improve our GWAS design by focusing not only on SNPs contributing to the overall risk for ADHD, but also on markers that may participate in the

combined or inattentive clinical subtypes. Following this strategy, which allows capturing additional associations that might have been skipped in previous studies that focused on the overall ADHD sample, we found preliminary evidence for the involvement of *FBXO33* in combined ADHD but not in the inattentive subgroup. These findings are in agreement with previous reports pointing to the validity of the DSM-IV distinction between the combined and predominantly inattentive types, support previous studies that find differential genetic components across ADHD subtypes and suggest that the combined group may represent a distinctive and more homogeneous phenotype that may facilitate the identification of genetic factors contributing to ADHD (Larsson et al, 2006; Ribases et al, 2008; Ribases et al, 2009; Todd et al, 2001). Thus, the identification of phenotypic characteristics that define subgroups of patients affected by specific sets of genes, such as clinical subtypes, may be an alternative approach to reduce genetic heterogeneity in ADHD. However, we cannot exclude that the limited sample size of the inattentive group may account for the absence of association observed when this ADHD subtype was considered.

Fifth, since heterogeneity may increase in large multi-site designs, cases and controls included in the discovery sample were recruited by a single clinical group in a restricted geographic area (Barcelona) and had the same ethnic background (Spanish Caucasian). Diagnosis of ADHD was based on structured, systematic interviews with no variability in measurements across data. We used one single ascertainment approach with homogeneous semi-structured diagnostic assessments, which may facilitate the identification of risk variants that might be neglected by a broader recruitment strategy used in previous multi-site GWAS. In addition, given that using controls unscreened for the presence of the disorder and genotyping with different platforms may reduce power, the presence of ADHD-related symptoms was excluded in our controls, and a single genotyping platform, Illumina HumanOmni1-Quad, was used for both affected individuals and controls. However, despite our efforts to increase the homogeneity of the discovery cohort, our discovery GWAS did not have sufficient statistical power to unequivocally detect small to medium effects of common SNPs on ADHD at a genome-wide significant level. Our negative results may be explained by the existence of small genetic effects also in the adult form of ADHD, which would require larger and homogeneous sample collections and further replication efforts to be reliably identified.

In conclusion, we performed a two-step GWAS to identify genetic risk factors for persistent ADHD. Our findings show tentative evidence for the involvement of *FBXO33* in the susceptibility to adult ADHD, point at the ubiquitination machinery as a new disease mechanism for the disorder and establish a rationale for searching additional risk variants within ubiquitin-related genes through additional collaborative efforts.

FUNDING AND DISCLOSURE

JB has been in the past 3 years a consultant to/member of advisory board of/and/or speaker for Janssen-Cilag BV, Eli Lilly, Bristol-Myers Squibb, Schering-Plough, UCB, Shire,

Novartis, and Servier. He is not an employee of any of these companies, and not a stock shareholder of any of these companies. He has no other financial or material support, including expert testimony, patents, and royalties. CCK takes part as an advisor in an Adult ADHD Advisory Workgroup of Eli Lilly and is a lecturer in their educational program 'Adult-ADHD Academy'. JH has in the past 3 years been a speaker for Janssen-Cilag BV, Eli Lilly, and Novartis. He is not an employee of any of these companies, and not a stock shareholder of any of these companies. AH received funding from the DFG (HE1446/9-1, HI865/2-1) and the BMBF (01GS0820). SVF receives royalties from books published by Guilford Press: *Straight Talk about Your Child's Mental Health* and Oxford University Press: *Schizophrenia: The Facts*.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all persons who kindly participated in this research. Part of the DNA extractions and genotyping was performed at the Spanish National Genotyping Centre (CEGEN-Barcelona). Principal investigators of the Nijmegen Biomedical Study are L.A.L.M. Kiemeney, J. de Graaf, A.L.M. Verbeek, D.W. Swinkels, and B. Franke. Principal investigators of the Cognomics Initiative are B. Franke, S. Fisher, G. Fernandez, H. Brunner, P. Hagoort, J. Buitelaar, H. van Bokhoven, and D. Norris. We are grateful to Silvia Fochs, Anna Sánchez, Maribel López, Nuria Pey, and Muriel Ferrer for their assistance in contacting the families and administering the questionnaires. Marta Ribasés is a recipient of a Miguel de Servet contract from the 'Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación', Spain. Financial support was received from 'Fundació La Marató de TV3' (ref. 092330/31), 'Instituto de Salud Carlos III-FIS' (PI11/00571, PI11/01629, PI12/01139, PI041436, PI081151, Red INMA G03/176, and CB06/02/0041), 'Plan Nacional Sobre Drogas' (PNSD#2011-0080), 'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca-AGAUR, Generalitat de Catalunya' (2014SGR1357, 2014SGR0932, and 1999SGR00241), Ministerio de Economía y Competitividad, Spain' (SAF2012-33484), and 'Departament de Salut', Government of Catalonia, Spain. The Dutch part of the project was supported by the Hersenstichting Nederland and by a Vici grant of The Netherlands Organisation for Scientific Research (NWO) to Barbara Franke. The Dutch controls were derived from the Nijmegen Biomedical Study (www.nijmegenbiomedischestudie.nl); European Commission (ENGAGE project and grant agreement HEALTH-F4-2007-201413). This work made use of the BIG (Brain Imaging Genetics) database, first established in Nijmegen, The Netherlands, in 2007. This resource is now part of Cognomics (www.cognomics.nl), a joint initiative by researchers of the Donders Centre for Cognitive Neuroimaging, the Human Genetics and Cognitive Neuroscience departments of the Radboud University Medical Centre and the Max Planck Institute for Psycholinguistics in Nijmegen. The Cognomics Initiative is supported by the participating departments and centers and by external grants, ie, the Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure (The Netherlands; BBMRI-NL), the Hersenstichting Nederland and The Netherlands Organisation for

Scientific Research (NWO). Funding for the Norwegian cohort was provided by the K.G. Jebsen Foundation, the Norwegian Research Council, and Regional Health Authority of Western Norway. The sample used in this study is part of the international multicentre persistent ADHD collaboration (IMpACT). IMpACT unites major research centres working on the genetics of ADHD persistence across the lifespan and has participants in the Netherlands, Germany, Spain, Norway, the United Kingdom, the United States, Brazil and Sweden. Principal investigators of IMpACT are: Barbara Franke (chair), Andreas Reif, Stephen V. Faraone, Jan Haavik, Bru Cormand, Antoni Ramos Quiroga, Philip Asherson, Klaus-Peter Lesch, Jonna Kuntsi, Claiton Bau, Jan Buitelaar, Stefan Johansson, Henrik Larsson, Alysya Doyle, and Eugenio Grevet.

REFERENCES

- Biederman J (2005). Attention-deficit/hyperactivity disorder: a selective overview. *Biol Psychiatry* 57: 1215–1220.
- Biederman J, Faraone S, Milberger S, Curtis S, Chen L, Marris A et al (1996). Predictors of persistence and remission of ADHD into adolescence: results from a four-year prospective follow-up study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 35: 343–351.
- Biederman J, Faraone SV (2005). Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet* 366: 237–248.
- Browning BL, Browning SR (2009). A unified approach to genotype imputation and haplotype phase inference for large data sets of trios and unrelated individuals. *Am J Hum Genet* 84: 210–223.
- Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Yi Q, Kruglyak L, Nickerson DA (2004). Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analysis using linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet* 74: 106–120.
- Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR (2003). ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res* 31: 3568–3571.
- Clayton D (2013). snpStats: SnpMatrix and XSNpMatrix classes and methods. R package version 1.14.0.
- Cubillo A, Rubia K (2010). Structural and functional brain imaging in adult attention-deficit/hyperactivity disorder. *Expert Rev Neurother* 10: 603–620.
- Chang Z, Lichtenstein P, Asherson PJ, Larsson H (2013). Developmental twin study of attention problems: high heritabilities throughout development. *JAMA Psychiatry* 70: 311–318.
- Chou PY, Fasman GD (1974). Prediction of protein conformation. *Biochemistry* 13: 222–245.
- de Bruijn DR, van Dijk AH, Pfundt R, Hoischen A, Merckx GF, Gradek GA et al (2010). Severe progressive autism associated with two de novo changes: a 2.6-Mb 2q31.1 deletion and a balanced t(14;21)(q21.1;p11.2) translocation with long-range epigenetic silencing of LRFN5 expression. *Mol Syndromol* 1: 46–57.
- Fairbrother WG, Yeh RF, Sharp PA, Burge CB (2002). Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science* 297: 1007–1013.
- Faraone SV, Biederman J, Feighner JA, Monuteaux MC (2000a). Assessing symptoms of attention deficit hyperactivity disorder in children and adults: which is more valid? *J Consult Clin Psychol* 68: 830–842.
- Faraone SV, Biederman J, Spencer T, Wilens T, Seidman LJ, Mick E et al (2000b). Attention-deficit/hyperactivity disorder in adults: an overview. *Biol Psychiatry* 48: 9–20.
- Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE, Smoller JW, Goralnick JJ, Holmgren MA et al (2005). Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57: 1313–1323.

- Flood WD, Moyer RW, Tsykin A, Sutherland GR, Koblar SA (2004). Nxf and Fbxo33: novel seizure-responsive genes in mice. *Eur J Neurosci* **20**: 1819–1826.
- Franke B, Faraone SV, Asherson P, Buitelaar J, Bau CH, Ramos-Quiroga JA et al (2012). The genetics of attention deficit/hyperactivity disorder in adults, a review. *Mol Psychiatry* **17**: 960–987.
- Franke B, Neale BM, Faraone SV (2009). Genome-wide association studies in ADHD. *Hum Genet* **126**: 13–50.
- Gizer IR, Ficks C, Waldman ID (2009). Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet* **126**: 51–90.
- Glessner JT, Wang K, Cai G, Korvatska O, Kim CE, Wood S et al (2009). Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature* **459**: 569–573.
- González JR, Armengol L, Solé X, Guinó E, Mercader JM, Estivill X et al (2007). SNPassoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* **23**: 644–645.
- Heinemeyer T, Wingender E, Reuter I, Hermjakob H, Kel AE, Kel OV et al (1998). Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res* **26**: 362–367.
- Hinney A, Scherag A, Jarick I, Albayrak O, Putter C, Pechlivanis S et al (2011). Genome-wide association study in German patients with attention deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **156B**: 888–897.
- Holmans P, Green EK, Pahwa JS, Ferreira MAR, Purcell SM, Sklar P (2009). Gene ontology analysis of GWAS datasets provide insights into the biology of bipolar disorder. *Am J Hum Genet* **85**: 13–24.
- International HapMap Consortium (2003). The International HapMap Project. *Nature* **426**: 789–796.
- Kessler RC, Adler LA, Barkley R, Biederman J, Conners CK, Faraone SV et al (2005). Patterns and predictors of attention-deficit/hyperactivity disorder persistence into adulthood: results from the national comorbidity survey replication. *Biol Psychiatry* **57**: 1442–1451.
- Kooij JJ, Buitelaar JK, van den Oord EJ, Furer JW, Rijnders CA, Hodiamont PP (2005). Internal and external validity of attention-deficit hyperactivity disorder in a population-based sample of adults. *Psychol Med* **35**: 817–827.
- Kuntsi J, Rijdsdijk F, Ronald A, Asherson P, Plomin R (2005). Genetic influences on the stability of attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms from early to middle childhood. *Biol Psychiatry* **57**: 647–654.
- Lafreniere RG, Rouleau GA (2012). Identification of novel genes involved in migraine. *Headache* **52**(Suppl 2): 107–110.
- Larsson H, Lichtenstein P, Larsson JO (2006). Genetic contributions to the development of ADHD subtypes from childhood to adolescence. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **45**: 973–981.
- Lasky-Su J, Anney RJ, Neale BM, Franke B, Zhou K, Maller JB et al (2008a). Genome-wide association scan of the time to onset of attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **147B**: 1355–1358.
- Lasky-Su J, Neale BM, Franke B, Anney RJ, Zhou K, Maller JB et al (2008b). Genome-wide association scan of quantitative traits for attention deficit hyperactivity disorder identifies novel associations and confirms candidate gene associations. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **147B**: 1345–1354.
- Lee SH, Ripke S, Neale BM, Faraone SV, Purcell SM, Perlis RH et al (2013). Genetic relationship between five psychiatric disorders estimated from genome-wide SNPs. *Nat Genet* **45**: 984–994.
- Lee PH, Shatkay H (2009). An integrative scoring system for ranking SNPs by their potential deleterious effects. *Bioinformatics* **25**: 1048–1055.
- Lesch KP, Timmesfeld N, Renner TJ, Halperin R, Roser C, Nguyen TT et al (2008). Molecular genetics of adult ADHD: converging evidence from genome-wide association and extended pedigree linkage studies. *J Neural Transm* **115**: 1573–1585.
- Lesch KP, Selch S, Renner TJ, Jacob C, Nguyen TT, Hahn T et al (2011). Genome-wide copy number variation analysis in attention-deficit/hyperactivity disorder: association with neuro-peptide Y gene dosage in an extended pedigree. *Mol Psychiatry* **16**: 491–503.
- Liu JZ, McRae AF, Nyholt DR, Medland SE, Wray NR, Brown KM et al (2010). A versatile gene-based test for genome-wide association studies. *Am J Hum Genet* **87**: 139–145.
- Maldjian JA, Laurienti PJ, Kraft RA, Burdette JH (2003). An automated method for neuroanatomic and cytoarchitectonic atlas-based interrogation of fMRI data sets. *Neuroimage* **19**: 1233–1239.
- Mick E, Todorov A, Smalley S, Hu X, Loo S, Todd RD et al (2010). Family-based genome-wide association scan of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **49**: 898–905.e893.
- Millar JK, Pickard BS, Mackie S, James R, Christie S, Buchanan SR et al (2005). DISC1 and PDE4B are interacting genetic factors in schizophrenia that regulate cAMP signaling. *Science* **310**: 1187–1191.
- Neale BM, Lasky-Su J, Anney R, Franke B, Zhou K, Maller JB et al (2008). Genome-wide association scan of attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **147B**: 1337–1344.
- Neale BM, Medland S, Ripke S, Anney RJ, Asherson P, Buitelaar J et al (2010a). Case-control genome-wide association study of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **49**: 906–920.
- Neale BM, Medland SE, Ripke S, Asherson P, Franke B, Lesch KP et al (2010b). Meta-analysis of genome-wide association studies of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **49**: 884–897.
- Nijmeijer JS, Arias-Vasquez A, Rommelse NN, Altink ME, Anney RJ, Asherson P et al (2010). Identifying loci for the overlap between attention-deficit/hyperactivity disorder and autism spectrum disorder using a genome-wide QTL linkage approach. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **49**: 675–685.
- Price TS, Simonoff E, Asherson P, Curran S, Kuntsi J, Waldman I et al (2005). Continuity and change in preschool ADHD symptoms: longitudinal genetic analysis with contrast effects. *Behav Genet* **35**: 121–132.
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D et al (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* **81**: 559–575.
- Ribases M, Hervas A, Ramos-Quiroga JA, Bosch R, Bielsa A, Gastaminza X et al (2008). Association study of 10 genes encoding neurotrophic factors and their receptors in adult and child attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* **63**: 935–945.
- Ribases M, Ramos-Quiroga JA, Hervas A, Bosch R, Bielsa A, Gastaminza X et al (2009). Exploration of 19 serotonergic candidate genes in adults and children with attention-deficit/hyperactivity disorder identifies association for 5HT2A, DDC and MAOB. *Mol Psychiatry* **14**: 71–85.
- Ripke S, O'Dushlaine C, Chambert K, Moran JL, Kahler AK, Akterin S et al (2013a). Genome-wide association analysis identifies 13 new risk loci for schizophrenia. *Nat Genet* **45**: 1150–1159.
- Ripke S, Wray NR, Lewis CM, Hamilton SP, Weissman MM, Breen G et al (2013b). A mega-analysis of genome-wide association studies for major depressive disorder. *Mol Psychiatry* **18**: 497–511.
- Rivero O, Sich S, Popp S, Schmitt A, Franke B, Lesch KP (2013). Impact of the ADHD-susceptibility gene CDH13 on development and function of brain networks. *Eur Neuropsychopharmacol* **23**: 492–507.
- Rommelse NN, Franke B, Geurts HM, Hartman CA, Buitelaar JK (2010). Shared heritability of attention-deficit/hyperactivity

- disorder and autism spectrum disorder. *Eur Child Adolesc Psychiatry* **19**: 281–295.
- Ruderfer DM, Fanous AH, Ripke S, McQuillin A, Amdur RL, Gejman PV *et al* (2013). Polygenic dissection of diagnosis and clinical dimensions of bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* **19**: 1017–1024.
- Ryan MM, Lockstone HE, Huffaker SJ, Wayland MT, Webster MJ, Bahn S (2006). Gene expression analysis of bipolar disorder reveals downregulation of the ubiquitin cycle and alterations in synaptic genes. *Mol Psychiatry* **11**: 965–978.
- Sánchez-Mora C, Ribasés M, Ramos-Quiroga JA, Casas M, Bosch R, Boreatti-Hümmer A *et al* (2010). Meta-analysis of brain-derived neurotrophic factor p.Val66Met in adult ADHD in four European populations. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **153B**: 512–523.
- Silk T, Vance A, Rinehart N, Egan G, O’Boyle M, Bradshaw JL *et al* (2005). Fronto-parietal activation in attention-deficit hyperactivity disorder, combined type: functional magnetic resonance imaging study. *Br J Psychiatry* **187**: 282–283.
- Skol AD, Scott LJ, Abecasis GR, Boehnke M (2006). Joint analysis is more efficient than replication-based analysis for two-stage genome-wide association studies. *Nat Genet* **38**: 209–213.
- Stergiakouli E, Hamshere M, Holmans P, Langley K, Zaharieva I, Hawi Z *et al* (2012). Investigating the contribution of common genetic variants to the risk and pathogenesis of ADHD. *Am J Psychiatry* **169**: 186–194.
- Stranger BE, Forrest MS, Dunning M, Ingle CE, Beazley C, Thorne N *et al* (2007a). Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science* **315**: 848–853.
- Stranger BE, Nica AC, Forrest MS, Dimas A, Bird CP, Beazley C *et al* (2007b). Population genomics of human gene expression. *Nat Genet* **39**: 1217–1224.
- Stray LL, Kristensen O, Lomeland M, Skorstad M, Stray T, Tonnessen FE (2013). Motor regulation problems and pain in adults diagnosed with ADHD. *Behav Brain Funct* **9**: 18.
- Tai HC, Schuman EM (2008). Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci* **9**: 826–838.
- Todd RD, Rasmussen ER, Neuman RJ, Reich W, Hudziak JJ, Bucholz KK *et al* (2001). Familiality and heritability of subtypes of attention deficit hyperactivity disorder in a population sample of adolescent female twins. *Am J Psychiatry* **158**: 1891–1898.
- Viechtbauer W (2010). Conducting meta-analyses in R with the metafor package. *J Stat Softw* **36**: 1–48.
- Wang K, Zhang H, Ma D, Bucan M, Glessner JT, Abrahams BS *et al* (2009). Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. *Nature* **459**: 528–533.
- Wang Z, Rolish ME, Yeo G, Tung V, Mawson M, Burge CB (2004). Systematic identification and analysis of exonic splicing silencers. *Cell* **119**: 831–845.
- Xu Z, Taylor JA (2009). SNPinfo: integrating GWAS and candidate gene information into functional SNP selection for genetic association studies. *Nucleic Acids Res* **37**: W600–W605.
- Yang L, Neale BM, Liu L, Lee SH, Wray NR, Ji N *et al* (2013). Polygenic transmission and complex neuro developmental network for attention deficit hyperactivity disorder: genome-wide association study of both common and rare variants. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **162B**: 419–430.
- Zhao JH (2013). gap: Genetic Analysis Package. R package version 1.1-10.
- Zhou K, Dempfle A, Arcos-Burgos M, Bakker SC, Banaschewski T, Biederman J *et al* (2008). Meta-analysis of genome-wide linkage scans of attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **147B**: 1392–1398.

Supplementary Information accompanies the paper on the Neuropsychopharmacology website (<http://www.nature.com/npp>)

