

DOCTORAT EN PSIQUIATRIA  
DEPARTAMENT DE PSIQUIATRIA I MEDICINA LEGAL  
FACULTAT DE MEDICINA  
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA  
HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU

# **Estudio de la interacción gen-ambiente en el Trastorno Límite de la Personalidad**

Tesis doctoral presentada por  
**Ana Martín Blanco**  
para obtener el grado de Doctor  
por la Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona, 2015

Directores:

**Dr. Juan Carlos Pascual Mateos**  
(Psiquiatra del Hospital de la Santa Creu  
i Sant Pau)

**Dr. Victor Pérez Sola**  
(Profesor titular del Departamento de  
Psiquiatría y Medicina Legal de la  
Universitat Autònoma de Barcelona y  
Director del INAD - Hospital del Mar -)



El Dr. Juan Carlos Pascual Mateos (psiquiatra del departamento de Psiquiatría del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau) y el Dr. Víctor Pérez Sola (profesor titular de la UAB y director del Instituto de Neuropsiquiatría y Adicciones del Hospital del Mar).

Certifican:

Que han supervisado la Tesis Doctoral titulada:

**Estudio de la interacción gen-ambiente en el Trastorno Límite de la Personalidad**

realizada por Ana Martín Blanco y consideran que es apta para el trámite de lectura y defensa pública delante de un tribunal, para optar al grado de Doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Por tal motivo queda constancia en el presente documento en Barcelona, 30 de octubre de 2015.

Firmado,

**Dr. Juan Carlos Pascual Mateos**

**Dr. Víctor Pérez Sola**



A Pablo e Irene.

A mis padres y mi hermano.



*“The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not ‘Eureka!’ but ‘That’s funny...’.”*

**Isaac Asimov**





Agradecimientos .....	11
Resumen .....	13
Prólogo .....	15
Abreviaturas .....	19
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>21</b>
1.1. Breve repaso del Trastorno Límite de la Personalidad .....	23
1.2. Factores ambientales en el TLP: el papel de los traumas infantiles .....	27
1.2.1. Traumas infantiles y psicopatología .....	28
1.2.1.1. Sistemas de respuesta al estrés .....	28
1.2.1.2. Efectos de los traumas infantiles sobre los sistemas de respuesta al estrés .....	31
1.2.2. Neurobiología de los traumas infantiles en el TLP .....	32
1.2.2.1. Influencia de los traumas infantiles sobre el eje HHA en el TLP .....	32
1.2.2.2. Influencia de los traumas infantiles sobre el sistema noradrenérgico en el TLP .....	33
1.3. Genética del TLP .....	34
1.3.1. Introducción a los estudios de genética en psiquiatría .....	35
1.3.1.1. Estudios de genética epidemiológica .....	35
1.3.1.1.1. Estudios de agregación familiar .....	35
1.3.1.1.2. Estudios de gemelos .....	35
1.3.1.1.3. Estudios de adopción .....	36
1.3.1.2. Estudios de genética molecular .....	36
1.3.1.2.1. Estudios de ligamiento .....	37
1.3.1.2.2. Estudios de asociación y GWAS .....	37
1.3.2. Estudio genéticos en el TLP .....	39
1.3.2.1. Estudios de agregación familiar .....	40
1.3.2.2. Estudios de gemelos .....	41
1.3.2.3. Estudios de ligamiento .....	41
1.3.2.4. Estudios de asociación .....	41
1.4. Hipótesis gen-ambiente en el TLP .....	49
1.4.1. Estudios de gemelos .....	53
1.4.2. Estudios de asociación .....	53
1.4.3. Estudios de metilación .....	53

2. PLANTEAMIENTO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	57
2.1. Planteamiento de la tesis doctoral .....	59
2.2. Hipótesis .....	60
2.3. Objetivos .....	61
3. MÉTODO .....	63
3.1. Diseño .....	65
3.2. Sujetos de estudio .....	65
3.3. Instrumentos de evaluación .....	66
3.4. Genotipado .....	68
3.5. Análisis estadísticos .....	70
3.6. Aspectos éticos .....	70
4. RESULTADOS .....	71
4.1. Estudio 1. Exploring the interaction between childhood maltreatment and temperamental traits on the severity of borderline personality disorder .....	73
4.2. Estudio 2. The role of hypothalamus-pituitary-adrenal genes and childhood trauma in borderline personality disorder .....	83
4.3. Estudio 3. An exploratory association study of the influence of noradrenergic genes and childhood trauma in Borderline Personality Disorder .....	95
4.4. Estudio 4. Association between methylation of the glucocorticoid receptor gene, childhood maltreatment, and clinical severity in borderline personality disorder .....	101
5. DISCUSIÓN GENERAL .....	115
6. LIMITACIONES .....	125
7. CONCLUSIONES .....	131
8. IMPLICACIONES Y FUTURAS LÍNEAS .....	135
9. BIBLIOGRAFÍA .....	139

Al echar la vista atrás y recordar cómo he llegado hasta aquí, veo que este camino habría sido sin duda más arduo de recorrer sin vuestra ayuda. Por eso estas líneas son un reconocimiento a todos vosotros, porque de una forma u otra este logro es también vuestro.

Mama, papa, gracias por todo. Gracias por dedicar vuestra vida y esfuerzo a intentar darnos a Carlos y a mí todas las herramientas necesarias para llegar donde estamos, gracias por vuestro apoyo incondicional, por corregirme cuando me he equivocado, por enseñarme, entre otras cosas, el valor de la constancia y el esfuerzo... y por estar siempre ahí.

Pablo, gracias por tu apoyo y tu paciencia por las tardes de faena, por los "5 minutos más" que se convertían en una hora... Sin ti, esta tesis seguro se habría demorado. Pero, sobre todo, gracias por estos nueve años maravillosos y por Irene, quien, sin ser aún consciente de ello, me ha facilitado también mucho la redacción de la tesis.

Gemmes, Alba, Andrea i Cristina. Gràcies per les estones genials que hem passat plegades durant la carrera i posteriorment, perquè sense la vostra amistat estic segura que tot hagués estat més dur.

Ana, Lili, Paula, Rosa, Ferran, Núria, Laia, Ruben, Adri, Mar, Cris. Gracias por hacer que los años de residencia y posteriores hayan sido tan divertidos, porque no sólo sois colegas a nivel profesional, sino también de los de verdad. Gracias también a todo el resto de compañeros de psiquiatría de Sant Pau, resis, psiquiatras, psicólogos, enfermería, auxiliares, personal de investigación, Enric, por todo lo que me habéis enseñado, que vas más allá de la psiquiatría o la investigación, por vuestra cercanía y amistad.

Albert, Mati, Cris, Quim y Juan Carlos, el equipo de "límites" del hospital, con vosotros he tenido el placer de aprender más sobre esta patología y disfrutar intentando ayudar a los pacientes, me habéis enseñado de primera mano de qué va esto de la investigación y sus entresijos y me habéis facilitado al máximo la realización de la tesis. Gracias por esto y más. Y, por supuesto, gracias a todos los pacientes y controles que desinteresadamente habéis accedido a participar en este proyecto.

Gracias también a los compañeros de Vall d'Hebron, Igualada y genética del hospital que habéis colaborado con nosotros en este proyecto, aportando ideas y consejos, evaluando

## ***Agradecimientos***

---

pacientes, preparando las muestras genéticas... vuestra ayuda ha sido indispensable y sin ella este trabajo no habría sido posible. Un agradecimiento especial a ti, M<sup>a</sup> Jesús, que has sido parte fundamental de este proyecto, porque no sólo nos has aportado ideas y conocimientos sobre genética, sino que nos has ayudado con los análisis estadísticos, la interpretación de los resultados, los dimes y diretes con los revisores y hasta el inglés, gracias por tu profesionalidad, cercanía y paciencia.

Finalmente gracias a mis directores de tesis, Juan Carlos y Víctor, por darme la oportunidad de trabajar con vosotros y hacer este proyecto, por allanarme el camino, por todo lo que me habéis enseñado antes y durante la realización de la tesis, y por todo lo que me podáis seguir enseñando a partir de ahora.

Gracias de verdad, a todos vosotros.

Las hipótesis actuales sobre la etiopatogenia del Trastorno Límite de la Personalidad (TLP) plantean que en el desarrollo del trastorno intervendrían tanto factores genéticos como ambientales que interaccionarían entre sí. Entre los factores ambientales destacan los antecedentes de traumas en la infancia. Entre los genéticos, se han estudiado principalmente los sistemas monoaminérgicos con resultados poco concluyentes, con lo que sería interesante investigar genes relacionados con el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA) y otros sistemas implicados en la respuesta del organismo al estrés, dado que se han descrito alteraciones en el funcionamiento de estos sistemas en relación con el TLP y con los traumas infantiles. El objetivo principal de esta tesis, por tanto, es identificar asociaciones entre variantes de genes de los sistemas de respuesta al estrés (eje HHA y sistema noradrenérgico) y el TLP, así como evaluar la posible modulación de dichas asociaciones por los antecedentes de traumas en la infancia. Los objetivos secundarios son evaluar si existe asociación entre los antecedentes de traumas infantiles y la gravedad del TLP, y si dicha asociación está mediada por los rasgos temperamentales, e investigar si los traumas infantiles y/o la gravedad del trastorno se asocian con una mayor metilación de un gen del eje HHA, el receptor de glucocorticoides (GR), en sujetos con TLP.

Los resultados de este trabajo sugieren la implicación en el desarrollo del TLP de genes de estos sistemas (*FKBP5*, *CRHR1*, *COMT*, *DBH* y *SLC6A2*) y su modulación por la presencia de traumas en la infancia. También muestran que el haber sufrido abuso emocional en la infancia se asociaría con una mayor gravedad del TLP, principalmente en aquellos sujetos con un elevado neuroticismo. Y, por último, que tanto los antecedentes de abuso físico como una mayor gravedad del trastorno se asociarían con un aumento de la metilación del GR en individuos con TLP.

Por tanto, los resultados observados apoyan la implicación de factores genéticos y ambientales tanto en la etiología del TLP como en su gravedad, y sugieren que los genes de los sistemas de respuesta al estrés, sujetos a la modulación por parte de los sucesos traumáticos en la infancia, se asociarían con el riesgo de padecer este trastorno. Además, abren las puertas a profundizar en el estudio del papel que juegan estas interacciones en el TLP y, en caso de confirmarse en muestras independientes, a diseñar estrategias terapéuticas o incluso preventivas centradas en estos factores.



La presente tesis se ha elaborado entre los años 2011 y 2015 durante mi ejercicio como psiquiatra y técnica de investigación en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. La financiación para llevarla a cabo se ha obtenido de una beca FIS (PI10/00253), así como de una beca como investigador en formación en el Institut de Recerca de dicho hospital. Se presenta en forma de compendio de publicaciones y la componen los siguientes cuatro estudios, todos ellos publicados en revistas internacionales indexadas y con factor de impacto:

#### **Estudio 1**

Martín-Blanco, A., Soler, J., Villalta, L., Feliu-Soler, A., Elices, M., Pérez, V., Arranz, M.J., Ferraz, L., Alvarez, E., & Pascual, J.C. (2014). Exploring the interaction between childhood maltreatment and temperamental traits on the severity of borderline personality disorder. *Comprehensive psychiatry*, 55, 311-318. doi: 10.1016/j.comppsy.2013.08.026.

#### **Estudio 2**

Martín-Blanco, A., Ferrer, M., Soler, J., Arranz, M.J., Vega, D., Calvo, N., Elices, M., Sanchez-Mora, C., García-Martínez, I., Salazar, J., Carmona, C., Bauzà, J., Prat, M., Pérez, V., & Pascual, J.C. (2015). The role of hypothalamus-pituitary-adrenal genes and childhood trauma in borderline personality disorder. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*. doi: 10.1007/s00406-015-0612-2.

#### **Estudio 3**

Martín-Blanco, A., Ferrer, M., Soler, J., Arranz, M.J., Vega, D., Bauzà, J., Calvo, N., Elices, M., Sanchez-Mora, C., García-Martínez, I., Salazar, J., Ribases, M., Carmona, C., Prat, M., & Pascual, J.C. (2015). An exploratory association study of the influence of noradrenergic genes and childhood trauma in Borderline Personality Disorder. *Psychiatry research*, 229, 589-592. doi: 10.1016/j.psychres.2015.07.046.

#### **Estudio 4**

Martín-Blanco, A., Ferrer, M., Soler, J., Salazar, J., Vega, D., Andión, O., Sanchez-Mora, C., Arranz, M.J., Ribases, M., Feliu-Soler, A., Pérez, V., & Pascual, J.C. (2014). Association between methylation of the glucocorticoid receptor gene, childhood maltreatment, and clinical severity in borderline personality disorder. *Journal of psychiatric research*, 57, 34-40. doi: 10.1016/j.jpsychires.2014.06.011.

Asimismo, a lo largo de estos años se han ido difundiendo los resultados de estos estudios en congresos de psiquiatría nacionales e internacionales, en forma de los pósteres y comunicaciones que se detallan a continuación:

**PÓSTERES:**

A. Martín-Blanco, L. Villalta, J. Soler, A. Feliu, M. Elices, J.C. Pascual. Relación entre la presencia de sucesos traumáticos en la infancia y las características clínicas del Trastorno Límite de la Personalidad. IX Congreso Nacional de Trastornos de la Personalidad. Zaragoza. 2012.

A. Martín-Blanco, M. Ferrer, J. Soler, O. Andiñón, D. Vega, A. Feliu-Soler, C. Sánchez-Mora, J. Salazar, M. Casas, V. Pérez, J.C. Pascual. Association study between HPA axis genes' polymorphisms and borderline personality disorder. 2nd International Congress on Borderline Personality Disorder. Amsterdam (Holanda). 2012.

A. Martín-Blanco, M. Ferrer, J. Soler, O. Andiñón, D. Vega, A. Feliu-Soler, C. Sánchez-Mora, J. Salazar, M. Casas, V. Pérez, J.C. Pascual. Methylation status of HPA axis genes in adults with borderline personality disorder with and without childhood trauma. 2nd International Congress on Borderline Personality Disorder. Amsterdam (Holanda). 2012.

L. Villalta Macià, M. Ferrer, A. Martín Blanco, J. Soler Rivaudi, O. Andiñón, D. Vega, M. Ribases, J. Salazar, V. Perez Sola, J.C. Pascual Mateos. Estudio de la asociación entre polimorfismos del eje HHA y el Trastorno Límite de Personalidad. XVI Congreso Nacional de Psiquiatría. Bilbao. 2012.

L. Villalta Macià, A. Martín Blanco, M. Ferrer, J. Soler Rivaudi, O. Andiñón, D. Vega, C. Sanchez Mora, J. Salazar, M. Casas, J.C. Pascual Mateos. Estado de metilación de los genes del eje HHA en adultos con Trastorno Límite de Personalidad con presencia o ausencia de historia de traumas en la infancia. XVI Congreso Nacional de Psiquiatría. Bilbao. 2012.

A. Martín-Blanco, M. Ferrer, J. Soler, O. Andiñón, D. Vega, A. Feliu-Soler, C. Sánchez-Mora, J. Salazar, J.C. Pascual. Genética del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal en el Trastorno Límite de la Personalidad. V Simposio sobre Trastorno Límite de la Personalidad. Capio Hospital General de Catalunya. Barcelona. 2013.



---

A. Martín-Blanco, M. Ferrer, D. Vega, M. Prat, N. Calvo, J. Salazar, M. Elices, M.J. Arranz, J. Soler, J.C. Pascual. Estudio de la interacción gen-ambiente en el Trastorno Límite de la Personalidad: influencia de los traumas en la infancia en la asociación entre genes del eje HHA y el TLP. X Congreso Nacional de Trastorno de la Personalidad. Barcelona. 2014. Ganador del 1º Premio al mejor póster.

A. Farré, A. Martín-Blanco, M. Ferrer, D. Vega, O. Andi6n, C. Sánchez-Mora, J. Salazar, A. Feliu-Soler, J. Soler, J.C. Pascual. Estudio de asociaci6n caso-control entre polimorfismos de 7 genes del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal y el trastorno límite de la personalidad. X Congreso Nacional de Trastorno de la Personalidad. Barcelona. 2014.

M.J. Arranz, A. Martín-Blanco, M. Ferrer, J. Soler, J. Salazar, D. Vega, O. Andi6n, C. Sanchez-Mora, M. Elices, J.C. Pascual. Gene x Environment interactions and Borderline Personality Disorder. XXIIInd World Congress of Psychiatric Genetics. Copenhagen (Dinamarca). 2014.

M.J. Arranz, A. Martín-Blanco, M. Ferrer, J. Soler, J. Salazar, D. Vega, O. Andi6n, C. Sanchez-Mora, A. Feliu-Soler, J.C. Pascual. Glucocorticoid receptor gene methylation and Borderline Personality Disorder. XXIIInd World Congress of Psychiatric Genetics. Copenhagen (Dinamarca). 2014.

A. Martín-Blanco, M. Ferrer, D. Vega, O. Andi6n, C. Sánchez-Mora, J. Salazar, A. Feliu-Soler, M. Elices, M.J. Arranz, J. Soler, J.C. Pascual. Case-control association study between 96 stress-related polymorphisms and Borderline Personality Disorder. 3rd International Congress on Borderline Personality Disorder and Allied Disorders. Roma (Italia). 2014.

J. Soler, M. Elices, A. Martín-Blanco, A. Feliu-Soler, J.C. Pascual. Factors associated with dispositional mindfulness in individuals with borderline personality disorder: the role of childhood trauma and temperamental traits. 3rd International Congress on Borderline Personality Disorder and Allied Disorders. Roma (Italia). 2014.

**COMUNICACIONES:**

A. Martín-Blanco. Estudios genéticos en el Trastorno Límite de la Personalidad, en la mesa "Investigación innovadora". Ponencia en el VIII Congreso Nacional de Trastornos de la Personalidad. Madrid. 2010.

A. Martín-Blanco. Influencia de la interacción gen-ambiente en la etiología del trastorno límite de la personalidad: estudio epigenético, en la mesa "Avances en la investigación neurobiológica del trastorno límite de la personalidad". Ponencia en el IX Congreso Nacional de Trastornos de la Personalidad. Zaragoza. 2012.

J.C. Pascual. Interacción de factores genéticos y traumas en la infancia en el desarrollo del TLP: fenotipo de hipersensibilidad en la infancia. Conferencia invitada en el V Simposio sobre Trastorno Límite de la Personalidad. Barcelona. 2013.

A. Martín, L. Villalta, M. Elices, A. Feliu, J. Soler, J.C. Pascual, A. Enfedaque, E. Álvarez. La interacció entre maltractament infantil i els tests de personalitat en la severitat del TLP. Ponencia en la XXVIII Jornada de teràpia del comportament i medicina conductual en la pràctica clínica. Barcelona. 2013.

A. Martín-Blanco, M. Ferrer, D. Vega, M. Prat, N. Calvo, J. Salazar, M. Elices, M.J. Arranz, J. Soler, J.C. Pascual. Estudio de la interacción gen-ambiente en el Trastorno Límite de la Personalidad: influencia de los traumas en la infancia en la asociación entre genes del eje HHA y el TLP. Comunicación oral en el X Congreso Nacional de Trastorno de la Personalidad. Barcelona. 2014.

A. Farré, A. Martín-Blanco, M. Ferrer, D. Vega, O. Andión, C. Sánchez-Mora, J. Salazar, A. Feliu-Soler, J. Soler, J.C. Pascual. Estudio de asociación caso-control entre polimorfismos de 7 genes del eje hipotálamo-hipofisario.adrenal y el trastorno límite de la personalidad. Comunicación oral en el X Congreso Nacional de Trastorno de la Personalidad. Barcelona. 2014.

J.C. Pascual. Repercusiones de los antecedentes traumáticos en el TLP. Conferencia invitada en el X Congreso Nacional de Trastorno de la Personalidad. Barcelona. 2014.

- ACTH:** del inglés *adrenocorticotropic hormone* (hormona adrenocorticotropa).
- ARNm:** ARN mensajero.
- BDNF:** del inglés *brain-derived neurotrophic factor* (factor neurotrófico derivado del cerebro).
- COMT:** catecol-O-metiltransferasa.
- CRF:** del inglés *corticotropin releasing factor* (factor liberador de corticotropina).
- CRHR1:** del inglés *corticotropin releasing hormone receptor 1* (receptor tipo 1 de la hormona liberadora de corticotropina).
- CRHR2:** del inglés *corticotropin releasing hormone receptor 2* (receptor tipo 2 de la hormona liberadora de corticotropina).
- CTQ-SF:** del inglés *Childhood Trauma Questionnaire - Short Form* (cuestionario de traumas infantiles, versión abreviada).
- DBH:** dopamina beta-hidroxilasa.
- DT:** desviación típica.
- DIB-R:** del inglés *Revised Diagnostic Interview for Borderlines* (entrevista diagnóstica revisada para límites).
- DSM:** del inglés *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales).
- DST:** del inglés *dexamethasone suppression test* (test de supresión con dexametasona).
- DZ:** gemelos dicigóticos.
- EWAS:** del inglés *epigenome-wide association study* (estudio de asociación del epigenoma completo).
- FKBP5:** del inglés *FK506 binding protein 5* (proteína 5 de unión a FK506).
- GR:** del inglés *glucocorticoid receptor* (receptor de glucocorticoides).
- GWAS:** del inglés *genome-wide association study* (estudio de asociación del genoma completo).
- HHA:** hipotalámico-hipofisario-adrenal.
- HTR:** del inglés *5-hydroxytryptamine receptors* (receptores de serotonina).
- IAPS:** del inglés *International Affective Picture System* (test de inducción emocional con imágenes).
- MAF:** del inglés *minor allele frequency* (alelo de menor frecuencia).
- MAO-A:** monoamino oxidasa A.
- MZ:** gemelos monocigóticos.
- NR3C1:** del inglés *nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1* (gen del receptor de glucocorticoides).

**SCID-II:** del inglés *Structured Clinical Interview for Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-IV (DSM-IV) Axis II Disorders* (entrevista clínica estructurada para los trastornos de eje II del DSM-IV).

**SLC6A2:** del inglés *solute carrier family 6 member 2* (transportador de noradrenalina).

**SLC6A3:** del inglés *solute carrier family 6 member 3* (transportador de dopamina).

**SLC6A4:** del inglés *solute carrier family 6 member 4* (transportador de serotonina).

**SNP:** del inglés *single nucleotide polymorphism* (polimorfismo de nucleótido simple).

**TDAA:** trastorno por déficit de atención e hiperactividad.

**TDM:** trastorno depresivo mayor.

**TEPT:** trastorno por estrés postraumático.

**TLP:** trastorno límite de la personalidad.

**TPH1:** triptófano hidroxilasa 1.

**TPH2:** triptófano hidroxilasa 2.

**TSST:** del inglés, *Trier Social Stress Test* (test de estrés psicosocial).

**VNTR:** del inglés *variable number tandem repeats* (número variable de repeticiones en tándem).

**ZKPQ:** del inglés *Zuckerman-Kuhlman Personality Questionnaire* (cuestionario de personalidad de Zuckerman-Kuhlman).

---

# Introducción

---



## 1.1. BREVE REPASO DEL TRASTORNO LÍMITE DE LA PERSONALIDAD

Según las últimas versiones del Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (*DSM*, del inglés *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*), el trastorno límite de la personalidad (TLP) formaría parte del grupo B de trastornos de personalidad, el cual incluye a los denominados sujetos inmaduros, inestables, dramáticos o emotivos. Se caracteriza por un patrón general de inestabilidad en la regulación de las emociones, las relaciones interpersonales, la autoimagen y el control de los impulsos (Tabla 1) (APA, 2013). Todavía hoy existe controversia sobre si alguno de estos síntomas predomina sobre el resto, pues mientras para algunos autores el síntoma clave sería la disregulación emocional, otros abogan por la impulsividad o las dificultades en las relaciones interpersonales (Linehan, 1987; Stanley & Siever, 2010). El DSM no prioriza unos síntomas respecto a otros, imponiendo como única condición para establecer el diagnóstico de TLP que se cumplan un mínimo de 5 de los 9 criterios clínicos definidos. Ello da como resultado hasta 256 combinaciones sintomáticas diferentes (Leichsenring, Leibing, Kruse, New, & Leweke, 2011), lo que explica la gran heterogeneidad clínica que existe dentro de este trastorno, y, en consecuencia, la dificultad a la hora de llevar a cabo estudios científicos en este campo. También contribuye a esta dificultad la elevada comorbilidad con otros trastornos tanto de eje I, principalmente trastornos afectivos, de ansiedad y de consumo de sustancias, como de eje II (Leichsenring et al., 2011).

**Tabla 1. Criterios DSM-5 para el TLP.**

### **TRASTORNO DE PERSONALIDAD TIPO BORDERLINE O LÍMITE**

**Patrón dominante de inestabilidad de las relaciones interpersonales, de la autoimagen y de los afectos, e impulsividad intensa, que comienza en las primeras etapas de la edad adulta y está presente en diversos contextos, y que se manifiesta por cinco (o más) de los siguientes hechos:**

1. Esfuerzos desesperados para evitar el desamparo real o imaginado. (Nota: No incluir el comportamiento suicida ni las conductas autolesivas que figuran en el Criterio 5).
2. Patrón de relaciones interpersonales inestables e intensas que se caracteriza por una alternancia entre los extremos de idealización y de devaluación.
3. Alteración de la identidad: inestabilidad intensa y persistente de la autoimagen y del sentido del yo.
4. Impulsividad en dos o más áreas que son potencialmente autolesivas (p. ej., gastos, sexo, drogas, conducción temeraria, atracones alimentarios). (Nota: No incluir el comportamiento suicida ni las conductas autolesivas que figuran en el Criterio 5).
5. Comportamiento, actitud o amenazas recurrentes de suicidio, o conductas autolesivas.
6. Inestabilidad afectiva debida a una reactividad notable del estado de ánimo (p. ej., episodios intensos de disforia, irritabilidad o ansiedad que generalmente duran unas horas y, rara vez, más de unos días).
7. Sensación crónica de vacío.
8. Enfado inapropiado e intenso, o dificultad para controlar la ira (p. ej., exhibición frecuente de genio, enfado constante, peleas físicas recurrentes).
9. Ideas paranoides transitorias relacionadas con el estrés o síntomas disociativos graves.

Aunque en el DSM-5 se han mantenido los mismos criterios diagnósticos que en versiones previas del manual, se ha propuesto una clasificación alternativa según la cual el TLP se caracterizaría por dificultades específicas en el funcionamiento de la personalidad (criterio A) y rasgos patológicos de personalidad (criterio B). Estos rasgos patológicos se darían en los dominios de afectividad negativa (labilidad emocional, ansiedad, inseguridad de separación y depresión), desinhibición (impulsividad y asunción de riesgos) y antagonismo (hostilidad) (Tabla 2).

Tabla 2. Propuesta alternativa de criterios TLP en el DSM-5 sección III.
<b>A. Deterioro moderado o grave del funcionamiento de la personalidad, que se manifiesta por las dificultades características en dos o más de las cuatro áreas siguientes:</b>
<p><b>1. Identidad:</b> autoimagen marcadamente pobre, poco desarrollada o inestable, a menudo asociada a un exceso de autocrítica; sentimientos crónicos de vacío; estados disociativos bajo estrés.</p> <p><b>2. Autodirección:</b> inestabilidad en las metas, aspiraciones, valores o planes de futuro.</p> <p><b>3. Empatía:</b> capacidad disminuida para reconocer los sentimientos y necesidades de los demás, asociada a la hipersensibilidad interpersonal (con tendencia a sentirse menospreciado o insultado); percepciones de los demás sesgadas selectivamente hacia atributos negativos o vulnerables.</p> <p><b>4. Intimidación:</b> relaciones cercanas intensas, inestables y conflictivas, marcadas por la desconfianza, la necesidad y la preocupación ansiosa por un abandono real o imaginario; las relaciones íntimas son vistas dicotómicamente entre la idealización y la devaluación, que conlleva a la alternancia correspondiente entre sobreimplicación y distanciamiento.</p>
<b>B. Cuatro o más de los siguientes siete rasgos patológicos de personalidad, al menos uno de los cuales debe ser (5) impulsividad, (6) la toma riesgos (6), o (7) hostilidad:</b>
<p><b>1. Labilidad emocional (un aspecto de la afectividad negativa):</b> experiencias emocionales inestables y estado de ánimo con cambios frecuentes; las emociones se alteran fácil, intensa y/o desproporcionadamente con los acontecimientos y circunstancias.</p> <p><b>2. Ansiedad (un aspecto de la afectividad negativa):</b> sentimientos intensos de nerviosismo, tensión o pánico, a menudo en respuesta a tensiones interpersonales; se preocupan por los efectos negativos de las experiencias desagradables del pasado y posibilidades futuras negativas; sensación de miedo, aprensión o amenaza ante la incertidumbre; temor a desmoronarse o a perder el control.</p> <p><b>3. Inseguridad de separación (un aspecto de la afectividad negativa):</b> temores de rechazo o separación de figuras significativas, asociados con el miedo a la dependencia excesiva y a la pérdida total de autonomía.</p> <p><b>4. Depresión (un aspecto de la afectividad negativa):</b> sentimientos frecuentes de estar hundido, de ser miserable y/o no tener esperanza; dificultad para recuperarse de este tipo de estados de ánimo; pesimismo sobre el futuro; vergüenza generalizada, sentimientos de inferioridad y baja autoestima; ideación y comportamiento suicida.</p> <p><b>5. Impulsividad (un aspecto de la desinhibición):</b> actuar en el fragor del momento en respuesta a estímulos inmediatos, actuando de forma repentina y sin un plan o reflexión acerca de las consecuencias, dificultad para trazar o seguir los planes; sentido de urgencia y comportamiento autolesivo en virtud de la angustia emocional.</p> <p><b>6. Asunción de riesgos (un aspecto de la desinhibición):</b> implicarse en prácticas peligrosas, de riesgo, y actividades potencialmente dañinas para sí mismo, innecesariamente y sin atender a las consecuencias; falta de preocupación por las limitaciones, y negación de la realidad del peligro personal.</p> <p><b>7. Hostilidad (un aspecto del antagonismo):</b> sentimientos de enojo persistentes o frecuentes; ira o irritabilidad en respuesta a ofensas e insultos menores.</p>

El TLP se trata, posiblemente, del trastorno de personalidad más frecuente. Se ha estimado que su prevalencia en la población general en países occidentales oscila entre el 0,5% y el 5,9% (Grant et al., 2008; Lenzenweger, Lane, Loranger, & Kessler, 2007), elevándose al 10% en pacientes psiquiátricos ambulatorios y al 15-25% en los hospitalizados (Torgersen, 2005). La edad media del diagnóstico está comprendida entre los 19 y los 34 años (Swartz, Blazer,



George, & Winfield, 1990), y, aunque anteriormente se creía que era más frecuente en mujeres, los últimos datos indican que no habría diferencias significativas entre sexos (Grant et al., 2008).

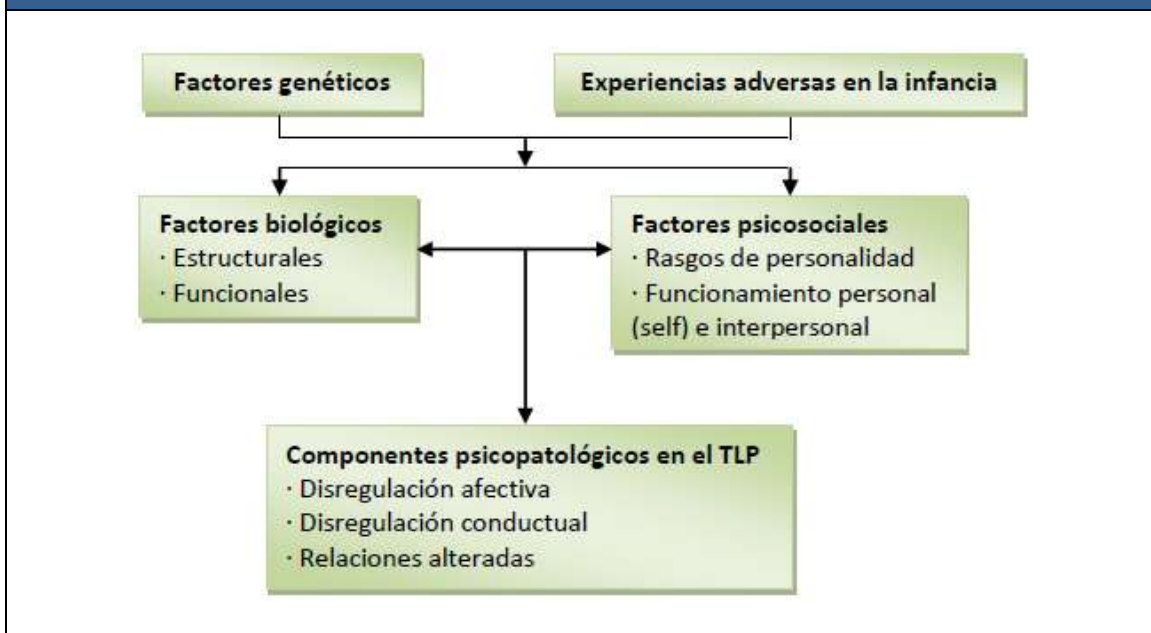
Este trastorno no sólo tiene una alta prevalencia, sino también un elevado coste personal, sanitario y social. Aproximadamente el 90% de los sujetos con TLP presentan conductas autolesivas y entre el 60% y el 78% llevan a cabo tentativas autolíticas (Zaheer, Links, & Liu, 2008; Zanarini et al., 2006b), habiéndose descrito que hasta el 8-10% de estos pacientes fallecen por suicidio consumado (Oldham, 2006). También son usuarios frecuentes de los servicios de asistencia primaria (Gross et al., 2002). Además, aunque se ha observado que en la mayoría de casos la evolución a largo plazo es hacia la mejoría, con tasas de remisión de hasta el 85-88% a los 10 años (Gunderson et al., 2011a; Zanarini et al., 2006a) y de aproximadamente el 92% a los 27 años (Paris & Zweig-Frank, 2001), en muchos casos quedarían síntomas residuales, principalmente a nivel afectivo y de funcionamiento psicosocial (Grant et al., 2008; Zanarini, Frankenburg, Reich, & Fitzmaurice, 2012). Se ha descrito que una mayor gravedad psicopatológica basal, así como los antecedentes de traumas infantiles y unas relaciones interpersonales deterioradas, predicen un mal pronóstico a los 2 años del diagnóstico (Gunderson et al., 2006), mientras que un diagnóstico temprano, la ausencia de abusos sexuales previos, tener rasgos temperamentales de bajo neuroticismo y elevada agradabilidad y no presentar comorbilidad con trastornos del clúster C serían factores de buen pronóstico a largo plazo (Zanarini et al., 2006a).

Con respecto al tratamiento, hasta la fecha no existe ningún fármaco aprobado para el abordaje del TLP (National Institute for Clinical Excellence [NICE], 2009). El uso de psicofármacos sólo se recomienda en el caso de patología comórbida y el tratamiento de primera elección sigue siendo la psicoterapia, especialmente la terapia dialéctico-conductual.

Una de las causas de que no haya fármacos eficaces, ni siquiera para síntomas individuales del trastorno, es probablemente el escaso conocimiento de sus bases etiopatogénicas. Hasta hace relativamente pocos años, las explicaciones sobre la etiología del TLP tendían a enfatizar el papel de la adversidad psicosocial y a menospreciar las contribuciones biológicas (Skodol et al., 2002). No obstante, poco a poco la biología ha ido ganando protagonismo y en la última década han proliferado los estudios de neuroimagen y genética. Los hallazgos más consistentes en neuroimagen han sido una reducción de volumen en el complejo amígdala-

hipocampo (Ruocco, Amirthavasagam, & Zakzanis, 2012), en el córtex cingulado anterior (Minzenberg, Fan, New, Tang, & Siever, 2008; Tebartz van Elst et al., 2003) y en el córtex orbitofrontal (Tebartz van Elst et al., 2003), una disminución de la conectividad fronto-límbica (Grant et al., 2007, Rüscher et al., 2007), alteraciones en la *default mode network* (Doll et al., 2013; Wolf et al., 2011) e hipoactivación amigdalárica ante emociones negativas (Ruocco, Amirthavasagam, Choi-Kain, & McMMain, 2013). Con respecto a la genética, su papel en la etiología del TLP se ha vuelto casi indiscutible y actualmente el modelo etiológico más aceptado es el de la interacción gen-ambiente o “modelo de diátesis-estrés” (Leichsenring et al., 2011), según el cual algunos individuos tendrían un genotipo que les haría más vulnerables para desarrollar psicopatología en caso de ser expuestos a sucesos adversos. De hecho, una de las teorías psicológicas más aceptadas del desarrollo del TLP es el “modelo biopsicosocial”, el cual postula que la genética individual y los antecedentes de traumas en la infancia condicionarían el desarrollo de factores biológicos y psicosociales los cuales, al interactuar, propiciarían el desarrollo de la psicopatología característica del TLP (Figura 1). (Beauchaine, Klein, Crowell, Derbidge, & Gatzke-Kopp, 2009; Crowell, Beauchaine, & Linehan, 2009).

Figura 1. Modelo biopsicosocial del TLP (adaptado de Leichsenring et al., 2011).



En los siguientes apartados se expondrá un resumen del conocimiento actual sobre los factores ambientales y genéticos asociados con el TLP, así como de la interacción de los mismos.

## 1.2. FACTORES AMBIENTALES EN EL TLP: EL PAPEL DE LOS TRAUMAS INFANTILES

Entre los factores ambientales que se han relacionado con el desarrollo del TLP, al que se le ha dado generalmente mayor importancia es al antecedente de sucesos traumáticos en la infancia. De hecho, entre el 30% y el 90% de los sujetos con TLP refieren haber sufrido algún tipo de trauma en los primeros años de vida (Battle et al., 2004; Bornovalova et al., 2013; Lobbestael, Arntz, & Bernstein, 2010; Zanarini, 2000). En estudios retrospectivos se han descrito porcentajes de abuso sexual de entre el 40% y el 71% (Battle et al., 2004; Zanarini, 2000), de abuso físico de entre el 25% y el 73% (Golier et al., 2003; Zanarini et al., 2000) y de abuso emocional de entre el 13% y el 76% (Battle et al., 2004; Laporte, Paris, Guttman, & Russell, 2011). Aunque históricamente el mayor protagonismo ha recaído sobre el abuso sexual, en los últimos años el interés se está centrando en el abuso/negligencia emocional (Hernandez, Arntz, Gaviria, Labad, & Gutiérrez-Zotes, 2012; Kuo, Khoury, Metcalfe, Fitzpatrick, & Goodwill, 2015); no obstante, aún no acaba de quedar claro si hay algún tipo de trauma infantil que se asocie con más frecuencia que el resto al desarrollo del TLP.

Pese a que los resultados de estos estudios parecen apuntar claramente hacia un papel relevante de los traumas infantiles en el TLP, no dejan de ser datos retrospectivos y, por tanto, sujetos a problemas tales como el sesgo de memoria. Sin embargo, la asociación entre maltrato infantil y TLP ha sido respaldada por estudios prospectivos (Johnson, Cohen, Brown, Smailes, & Bernstein, 1999; Johnson et al., 2001; Spataro, Mullen, Burgess, Wells, & Moss, 2004; Widom, Czaja, & Paris, 2009). Por ejemplo, Widom y colaboradores siguieron a 500 niños que habían sufrido algún trauma físico y/o sexual y a 396 controles apareados, y observaron que los niños con traumas infantiles cumplían criterios para TLP en la edad adulta con mayor frecuencia que los controles.

Además de con la propia enfermedad, los traumas infantiles también se asocian con la gravedad de los síntomas del TLP, así como con otros indicadores de seriedad como pueden ser el deterioro psicosocial (Silk, Lee, Hill, & Lohr, 1995; Zanarini et al., 2002) y los intentos de suicidio (Horesh, Nachshoni, Wolmer, & Toren, 2009; Soloff, Lynch, & Kelly, 2002).

Los antecedentes de traumas en la infancia no sólo se asocian con el TLP y su gravedad sino con el desarrollo de otros trastornos psiquiátricos. El mecanismo exacto por el cual pueden provocar psicopatología no es del todo conocido, pero la investigación realizada hasta la fecha ha aportado datos interesantes que se resumen a continuación.

### **1.2.1. Traumas infantiles y psicopatología**

Varios estudios preclínicos y clínicos han mostrado que durante la época perinatal y la infancia el ambiente ejerce un impacto crucial en la maduración de estructuras y funciones cerebrales (para una revisión: Bock, Rether, Gröger, Xie, & Braun, 2014; Bremner & Vermetten, 2001; Loman et al., 2010). El resultado de la exposición a sucesos vitales estresantes dependerá del tipo y la duración de la misma (Andersen, 2003; Bock et al., 2014), así como del estado madurativo del cerebro en el momento de la exposición, de tal forma que el impacto será mayor en períodos críticos en que haya una elevada plasticidad neuronal, y, por tanto, una mayor sensibilidad al ambiente (Lupien, McEwen, Gunnar, & Heim, 2009). Entre los cambios asociados a la exposición a factores estresantes se han descrito reducciones de volumen en áreas prefrontales (Baker et al., 2013; van Harmelen et al., 2010) y límbicas, como el hipocampo y la amígdala (Teicher, Anderson, & Polcari, 2012; Woon & Hedges, 2008).

Uno de los mecanismos por los cuales los factores estresantes podrían provocar alteraciones en el desarrollo de estructuras cerebrales es el propuesto por la hipótesis de neurotoxicidad (Packan & Sapolsky, 1990). Según esta hipótesis, el estrés mantenido provocaría una alteración de la función del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA) que resultaría en una respuesta ineficiente al estrés y/o en unos niveles de cortisol crónicamente elevados que provocarían daños a nivel cerebral. La función del eje HHA puede verse afectada por el estrés porque es uno de los principales sistemas del organismo para responder ante los factores estresantes. En el siguiente apartado se describe cómo responde el organismo ante el estrés y cómo pueden los traumas infantiles afectar a esta respuesta.

#### **1.2.1.1. Sistemas de respuesta al estrés**

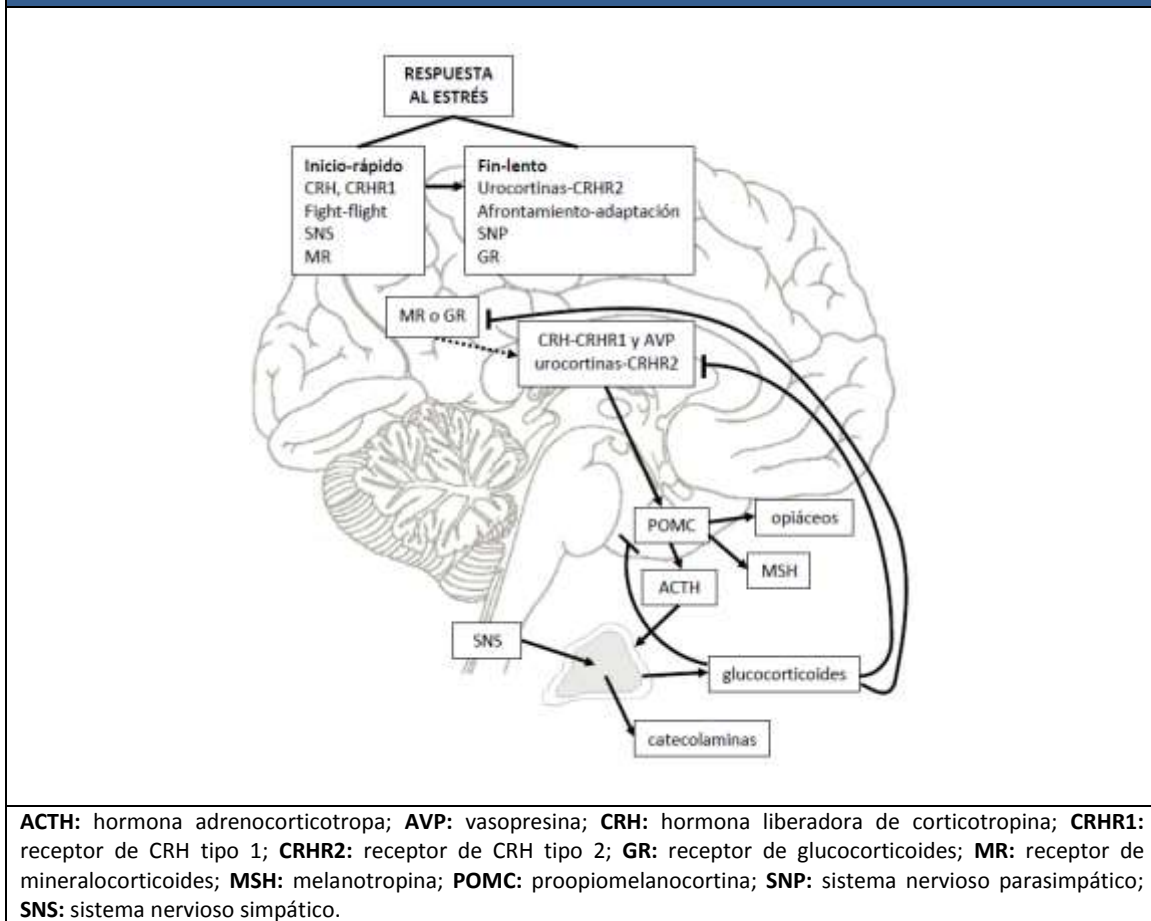
Se considera que un factor es estresante cuando amenaza al equilibrio u “homeostasis” del organismo. La respuesta fisiológica al estrés, también conocida como “alostasis”, consta de un componente psicológico y otro fisiológico (Sterling & Eyer, 1988). El psicológico incluye procesos que intentan predecir las consecuencias de la exposición al factor estresante y ejercer control sobre la situación. El fisiológico consiste en la activación del sistema nervioso simpático y del eje HHA, los cuales se encargan de la respuesta periférica y central, respectivamente. A nivel central también se produce la liberación de catecolaminas, entre ellas de noradrenalina a partir de la activación de los cuerpos neuronales del *locus coeruleus* (Bremner & Vermetten, 2001).

La respuesta fisiológica al estrés tiene dos modos de acción (de Kloet, Joëls, & Holsboer, 2005) (Figura 2):

- Modo rápido: es la respuesta inicial, conocida como *fight-flight*, y está mediada por el sistema simpático y el eje HHA (a través de los receptores tipo I de hormona liberadora de corticotropina - CRHR1 -). Este sistema es activado por vías que llegan al núcleo paraventricular del hipotálamo, entre ellas vías límbicas que se activan por estresores psicológicos y vías medulares ascendentes que transportan información sensorial y visceral. A nivel del eje HHA, se produce la liberación de factor liberador de corticotropina (CRF) desde el hipotálamo, desencadenando la secreción de hormona adrenocorticotropa (ACTH) desde la hipófisis y ésta, a su vez, la liberación de glucocorticoides por parte de la glándula suprarrenal. Una vez en el torrente sanguíneo, los glucocorticoides se unirán a los receptores mineralocorticoides y glucocorticoides, y controlarán la secreción del eje de forma retroactiva uniéndose a receptores tanto en la hipófisis como en el hipocampo. En esta fase tiene lugar también una liberación de catecolaminas y neuropéptidos varios que contribuirán a establecer un estado de alerta, de aumento de la atención y de excitación que facilitará una adecuada respuesta al factor estresante.
- Modo lento: se encarga de propiciar la adaptación y la finalización de la respuesta al estrés mediante las urocortinas II y III, las cuales tienen propiedades ansiolíticas y actúan a través de los receptores CRHR2. En esta fase tiene lugar también una regulación en la transcripción de genes a través de la unión del cortisol a los receptores mineralocorticoides y glucocorticoides, la cual propiciará, entre otras cosas, el almacenamiento de información para futuros usos.

Los corticosteroides actúan tanto en el modo rápido como en el lento. Cuando nos vemos expuestos a una situación estresante, se produce una secreción de glucocorticoides que alcanza sus niveles máximos hacia los 15-30 minutos y empieza a disminuir lentamente 60-90 minutos más tarde, normalizándose aproximadamente a las 2 horas del inicio de la respuesta. Como la afinidad de los glucocorticoides por los receptores de mineralocorticoides es mucho mayor que por los receptores de glucocorticoides, los primeros están más implicados en el inicio de la respuesta al estrés y los segundos en la finalización de dicha respuesta, movilizando los recursos energéticos necesarios para retornar a la homeostasis y para promover la transcripción de genes.

Figura 2. Modos de acción de la respuesta fisiológica al estrés (adaptado de de Kloet et al., 2005).



Un afrontamiento se considera efectivo cuando la respuesta al estrés se activa rápidamente cuando se necesita y se acaba de forma eficiente cuando ya no es necesaria. Si el afrontamiento no es efectivo, puede haber niveles excesivamente elevados de cortisol que, como ya se ha comentado, acaben provocando daños a nivel cerebral.

Existen diversas maneras de estudiar el funcionamiento del eje HHA. Las más empleadas en la investigación en psiquiatría son la medición de los niveles de cortisol en diversos momentos del día (en sangre o saliva, o mediante orina de 24 horas), el test de supresión con dexametasona (DST) y la prueba de estimulación con CRF. En el DST se administra dexametasona exógena y posteriormente se cuantifican los niveles de cortisol en sangre u orina, los cuales deberían disminuir. En la prueba de estimulación con CRF se administra corticotropina con el objetivo de activar el eje HHA; en ocasiones se hace en combinación con el DST, de tal forma que primero se inhibe el eje con dexametasona y a continuación se administra CRF, lo cual en condiciones normales no debería provocar secreción de cortisol

dado que el eje estaría suprimido por la dexametasona. Además de con CRF, el eje HHA también se puede estimular mediante procesos de inducción emocional, que consisten en someter al sujeto a situaciones estresantes como la visualización de imágenes o vídeos desagradables o la exposición a una evaluación social (Wingenfeld, Spitzer, Rullkötter, & Löwe, 2010).

#### **1.2.1.2. Efectos de los traumas infantiles sobre los sistemas de respuesta al estrés**

En modelos animales se ha visto que la exposición a factores estresantes en épocas vulnerables, como pueden ser las primeras etapas de la vida, puede afectar a la función de los sistemas de respuesta al estrés (Bremner, Krystal, Southwick, & Charney, 1996; de Kloet et al., 2005). Se ha descrito que el estrés temprano, como la separación materna o un cuidado materno deficiente, provocaría una respuesta glucocorticoidea elevada, una reducción de los receptores de glucocorticoides en áreas cerebrales como el hipocampo, el hipotálamo y el córtex frontal, un aumento del ARN mensajero (ARNm) del CRF hipotalámico, un aumento de la liberación de ACTH y de noradrenalina y una reducción de los autorreceptores alfa-2 del locus coeruleus, así como respuestas conductuales equivalentes a clínica ansiosa. Además, estos efectos serían prolongados en el tiempo y variarían en función del momento en que tuviese lugar la exposición (Lupien et al., 2009).

En humanos también se han descrito alteraciones en el funcionamiento del eje HHA asociadas a la exposición a sucesos traumáticos en la infancia, aunque los resultados son menos consistentes. Por ejemplo, se han descrito tanto reducciones (de Bellis et al., 1994a) como aumentos (Kaufman et al., 1997) de la respuesta de ACTH al test de estimulación con CRF en niñas con antecedentes de abuso sexual, o resultados opuestos en el DST en niños con fallecimiento parental súbito (Weller, Weller, Fristad, & Bowes, 1990) con respecto a los expuestos a un terremoto (Goenjian et al., 1996). También se han descrito alteraciones del ritmo de secreción del cortisol, con niveles bajos de cortisol salival por las mañanas y falta de reducción por las tardes (Carlson and Earls, 1997; Goenjian et al., 1996). En adultos con historia de traumas en la infancia se han visto asimismo alteraciones del eje, pero igualmente poco consistentes. Así, se ha descrito un aumento del cortisol en orina de 24 horas en mujeres con abuso sexual infantil y trastorno por estrés postraumático (TEPT) (Lemieux & Coe, 1995), pero en cambio no en veteranos de Vietnam o supervivientes del holocausto con TEPT (Yehuda, 2000). En resumen, parece que tanto en niños como en adultos los traumas en la infancia provocarían un funcionamiento aberrante del eje HHA, aunque aún no queda claro el

tipo de disfunción. Posiblemente influyan otros factores como el tipo de trauma o, como se ha descrito en estudios con animales, el momento en que éste tenga lugar.

Como hemos visto, en la respuesta al estrés intervienen también los sistemas catecolaminérgicos, entre ellos el sistema noradrenérgico (Bremner & Vermeten, 2001). Pocos estudios en humanos han examinado la función de este sistema en relación con el trauma infantil, aunque parecen apuntar hacia un aumento de los niveles de noradrenalina. Así, en niños con antecedentes de abuso en que no se evaluó el diagnóstico de TEPT encontraron aumento de catecolaminas en orina de 24 horas (De Bellis, Lefter, Trickett, & Putnam, 1994b), aumento que también se vio en sujetos con TEPT, tanto niños (De Bellis et al., 1999) como adultos (De Bellis et al., 1994b).

En resumen, todos estos hallazgos sugieren que los sucesos ambientales adversos tempranos se asociarían con alteraciones persistentes en el eje HHA y en la respuesta noradrenérgica, lo cual podría provocar una vulnerabilidad aumentada para el desarrollo de psicopatología.

### **1.2.2. Neurobiología de los traumas infantiles en el TLP**

Como acabamos de ver, los traumas infantiles por sí solos se asociarían con alteraciones en la función de los sistemas de respuesta al estrés. Se ha intentado dilucidar si los traumas infantiles también producirían estos cambios en sujetos con TLP, llevándose a cabo varios estudios que han explorado principalmente la función del eje HHA. Dicha función se ha evaluado desde múltiples perspectivas (niveles basales de cortisol, DST, test de estimulación con CRF y test de estimulación con estresor psicosocial, fundamentalmente), pero hay muy pocos estudios en general, con lo cual los resultados deberían interpretarse con cautela. Veamos a continuación un resumen de estos resultados.

#### **1.2.2.1. Influencia de los traumas infantiles sobre el eje HHA en el TLP**

Al comparar sujetos con TLP y controles sanos se ha observado que existiría una asociación entre los traumas y los niveles basales de cortisol, la cual sería independiente del diagnóstico de TLP, y que el sentido de dicha asociación (niveles aumentados o disminuidos) dependería del tipo de trauma (Carvalho Fernando et al., 2012; Simeon, Knutelska, Smith, Baker, & Hollander, 2007).



Por el contrario, parece que la presencia de traumas infantiles por sí sola en pacientes con TLP no influiría sobre la respuesta del eje al DST (Carrasco et al., 2007; Rinne et al., 2002), pero sí sobre la respuesta del eje a la estimulación posterior con CRF, con un aumento significativo de la ACTH y casi significativo del cortisol (Rinne et al., 2002). Por otra parte, en los sujetos con TLP parece que el efecto de los traumas infantiles sobre el eje HHA diferiría del del TEPT propiamente dicho (Goodman & Yehuda, 2002), pues los individuos con TLP y TEPT comórbido presentarían hipersupresión del eje en respuesta al DST en comparación con aquéllos con TLP sin TEPT (Grossman et al., 2003; Lange et al., 2005; Rinne et al., 2002). Incluso un estudio indica que el propio TLP, independientemente del TEPT, también alteraría la función del eje (Carrasco et al., 2007).

Con respecto a los niveles urinarios de cortisol en respuesta a un estresor psicosocial, se ha visto que los antecedentes de traumas infantiles correlacionan inversamente con el cortisol urinario basal (Simeon et al., 2007).

Otros estudios han examinado posibles disfunciones del eje HHA en sujetos con TLP sin tener en cuenta la presencia o no de traumas en la infancia (para una revisión: Zimmerman & Choi-Kan, 2009; Wingenfeld et al., 2010). Se han descrito varias alteraciones, principalmente una menor sensibilidad del eje, pero no acaba de quedar claro si dichas alteraciones se relacionan directamente con el TLP o median en la relación otros factores como podrían ser, precisamente, los traumas en la infancia.

#### **1.2.2.2. Influencia de los traumas infantiles sobre el sistema noradrenérgico en el TLP**

Hasta la fecha, sólo un estudio ha evaluado la influencia de los traumas infantiles sobre el sistema noradrenérgico en sujetos con TLP (Simeon et al., 2007). Este trabajo investigaba la reactividad del sistema noradrenérgico y del eje HHA en sujetos con TLP con diferentes grados de disociación y en controles sanos ante la exposición a un factor estresante psicosocial, el *Trier Social Stress Test* (TSST; Kirschbaum, Pirke, & Hellhammer, 1993). No hubo diferencias entre grupos en los niveles urinarios de noradrenalina basal ni en la reactividad noradrenérgica medida en plasma al estrés. En el grupo de TLP, la gravedad de la disociación tendía a correlacionar inversamente con la noradrenalina urinaria basal, así como positivamente con la reactividad noradrenérgica al estrés. Los traumas infantiles no correlacionaron con los niveles de noradrenalina.

Otros estudios han evaluado únicamente posibles alteraciones del sistema noradrenérgico en sujetos con TLP, sin tener en cuenta la presencia o no de traumas infantiles. En ellos no se cuantificaron directamente los niveles de noradrenalina, sino de alfa-amilasa, un marcador de la activación del sistema nervioso autónomo. Los resultados no son concluyentes. Mientras en dos estudios se vio una hiporreactividad de la alfa-amilasa ante estrés psicosocial (TSST) en sujetos con TLP en comparación con controles (Nater et al., 2010; Scott, Levy, & Granger, 2013), en otro se observó una hiperreactividad de dicha enzima durante un proceso de inducción emocional con imágenes desagradables (*International Affective Picture System – IAPS -*; Lang, Ohman, & Vaitl; 1988) (Feliu-Soler et al., 2013). Las diferencias en los resultados podrían deberse, entre otras causas, a los diferentes métodos de inducción emocional empleados (TSST vs. IAPS). En ninguno de los estudios se encontraron diferencias entre grupos en los niveles basales de alfa-amilasa.

De todos estos estudios, se podría concluir que, tal y como sucede en la población general, en los sujetos con TLP los traumas en la infancia se asociarían con alteraciones en el funcionamiento de los sistemas de respuesta al estrés (principalmente del eje HHA, puesto que del sistema noradrenérgico faltarían datos). La función de estos sistemas también diferiría entre sujetos con TLP y controles sanos, pero aún no acaba de quedar claro en qué sentido iría la diferencia y el papel que jugarían los traumas infantiles en dicha diferencia.

### **1.3. GENÉTICA DEL TLP**

El interés por el estudio genético en el TLP nace de los primeros estudios con familias y gemelos que mostraron una heredabilidad del trastorno. A raíz de ello, se han intentado buscar genes concretos asociados con esta patología, aunque como veremos esta tarea ha sido hasta el momento poco fructífera. A diferencia de otras patologías psiquiátricas, el estudio genético en el TLP está todavía poco desarrollado, son pocos los grupos de investigación que se dedican a ello y no se ha establecido aún una gran red de colaboración que permita hacer análisis exhaustivos en grandes muestras, lo cual podría explicar en parte la escasez de resultados. Antes de describir en detalle los estudios publicados, repasaremos algunos conceptos generales sobre los estudios de genética en psiquiatría.

### **1.3.1. Introducción a los estudios de genética en psiquiatría**

#### **1.3.1.1. Estudios de genética epidemiológica**

El objetivo principal de la genética epidemiológica es identificar el papel que juegan los factores genéticos, en interacción con factores ambientales, en el origen de las enfermedades. Incluye estudios de familias, estudios de gemelos y estudios de adopción.

##### *1.3.1.1.1. Estudios de agregación familiar*

Los estudios de agregación familiar (en inglés, *familial aggregation studies*), también denominados estudios de familias (en inglés, *family studies*), tratan de investigar la agregación o recurrencia de una determinada enfermedad en una familia comparando la prevalencia de dicha enfermedad en familiares de los casos índice (individuos afectados) con la prevalencia en familiares de los controles. Si los familiares de los sujetos afectados tienen un mayor riesgo de padecer la enfermedad, decimos que existe agregación familiar de dicha enfermedad. Una alta agregación familiar no es sinónimo de que la causa de la enfermedad sea únicamente genética, puesto que las familias no sólo comparten genes sino también influencias ambientales. Por ello, para distinguir entre factores genéticos y ambientales compartidos es preciso llevar a cabo estudios de gemelos.

##### *1.3.1.1.2. Estudios de gemelos*

Los estudios de gemelos (en inglés, *twin studies*) intentan medir la heredabilidad de un trastorno, definida ésta como la proporción de variación observada que puede atribuirse a factores genéticos heredados más que a factores ambientales. Se estima calculando la diferencia de concordancia para un rasgo o enfermedad entre gemelos monocigóticos (MZ), que comparten el 100% de su material genético, y gemelos dicigóticos (DZ), que comparten en promedio el 50% de sus genes (Boomsma, Busjahn, & Peltonen, 2002). Asumiendo que los factores de riesgo ambientales no difieren sistemáticamente, si se observa que los MZ son concordantes con mayor frecuencia que los DZ, puede concluirse que los factores genéticos están por lo menos parcialmente involucrados en el origen de dicha enfermedad. Si no hay diferencia entre MZ y DZ, se puede plantear que hay una mayor implicación de factores ambientales compartidos.

#### **1.3.1.1.3. Estudios de adopción**

Los estudios de adopción (en inglés, *adoption studies*) comparan la frecuencia de un determinado rasgo o enfermedad en un niño adoptado y en sus padres biológicos y padres adoptivos. El objetivo es intentar distinguir entre el factor genético (representado por los rasgos comunes entre los padres biológicos y el niño dado en adopción) y el factor ambiental (representado por los rasgos comunes entre los padres adoptivos y el niño adoptado) (Plomin, DeFries, McClearn, & Rutter, 1997).

Los estudios de agregación familiar, de gemelos y de adopción han visto que todos los trastornos psiquiátricos se agregan en familias, son heredables y no siguen una transmisión mendeliana (Kendler, 2013). Esto nos dice, entre otras cosas, que las enfermedades psiquiátricas son biológicas y que en su etiología intervienen factores comunes a los diferentes miembros de una familia (tanto genéticos como ambientales). Sin embargo, estos estudios no aportan datos sobre los mecanismos moleculares subyacentes a las enfermedades (Kendler, 2013). Para ello hay que llevar a cabo técnicas de genética molecular.

#### **1.3.1.2. Estudios de genética molecular**

Con los estudios de genética molecular se intenta comprobar la hipótesis de que un gen determinado se asocia o no con una enfermedad. Este gen, que por lo general se elige en base a los conocimientos existentes sobre las bases biológicas de dicha enfermedad, se denomina “gen candidato”. Los análisis más empleados son el análisis de ligamiento y el análisis de asociaciones alélicas, ambos basados en técnicas de clonación posicional.

Los estudios de genética molecular emplean los denominados marcadores genéticos. Un marcador genético (o marcador molecular) es un segmento de ADN, por lo general de función desconocida, del cual se conoce su localización dentro del cromosoma (llamada *locus*). Como los segmentos de ADN que se encuentran próximos en un cromosoma tienden a heredarse juntos, los marcadores se emplean a menudo como formas indirectas de rastrear el patrón hereditario de un gen que todavía no ha sido identificado, pero del que se conoce su ubicación aproximada. Se han localizado marcadores a lo largo de todo el genoma como parte del Proyecto del Genoma Humano (concretamente el proyecto HapMap: [www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)). Los marcadores genéticos son polimórficos, es decir, presentan varios alelos (también denominados variaciones) con una frecuencia relativamente alta en la población (superior al

1% para el menos frecuente); al ser polimórficos, los alelos se denominan polimorfismos (es decir, un polimorfismo es cada una de las variantes en la secuencia de ADN entre los individuos de una población determinada). La mayoría de los polimorfismos no se manifiestan externamente porque se encuentra en regiones del ADN no codificantes. Aunque existen varios tipos de polimorfismos, del que hablaremos en esta tesis es del polimorfismo de nucleótido simple (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphism*), que consiste en una variación del ADN que afecta a una sola base nitrogenada. Con el proyecto HapMap se han definido un conjunto reducido de SNPs altamente informativos a lo largo de todo el genoma, denominados TagSNPs. Otros tipos de polimorfismos son los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, del inglés *restriction fragment length polymorphism*), los microsatélites o repeticiones cortas en tándem (STR, del inglés *short tandem repeats*), el número variable de repeticiones en tándem (VNTR, del inglés *variable number tandem repeats*) o las inserciones/delecciones de uno o varios nucleótidos.

#### 1.3.1.2.1. Estudios de ligamiento

El análisis de ligamiento (en inglés, *linkage analysis*) es un método basado en familias para identificar genes que podrían estar implicados en la etiología de una enfermedad. Se fundamentan en la siguiente premisa: si individuos suficientemente relacionados comparten tanto un rasgo (por ejemplo, una enfermedad determinada) como un marcador genético, se puede inferir que existe un gen relacionado con dicho rasgo en las inmediaciones del marcador.

En las décadas de los 80 y 90 se hicieron múltiples estudios de ligamiento con el objetivo de identificar genes individuales implicados en las enfermedades psiquiátricas, pero hubo poco éxito porque no se lograron replicar los resultados (Amad, Ramoz, Thomas, Jardri, & Gorwood, 2014). Tampoco mejoró la situación al intentar conseguir muestras más grandes mediante estudios colaborativos o al realizar meta-análisis. El interés comenzó entonces a centrarse en los estudios de asociación de genes candidatos.

#### 1.3.1.2.2. Estudios de asociación y GWAS

Mientras que el análisis de ligamiento evalúa la cosegregación de alelos entre miembros de una familia, el análisis de asociación (en inglés, *association analysis*) es un método basado en la población (y más raramente en familias) que evalúa la diferencia en la frecuencia de

presentación de un alelo entre grupos de individuos afectados y no afectados por una enfermedad. Se basa, por tanto, en la asunción de que el alelo investigado se asocia con la enfermedad si difiere en frecuencia entre los dos grupos de individuos investigados.

La asociación entre un alelo y un fenotipo puede ocurrir por tres motivos (Wyszynski, 1998):

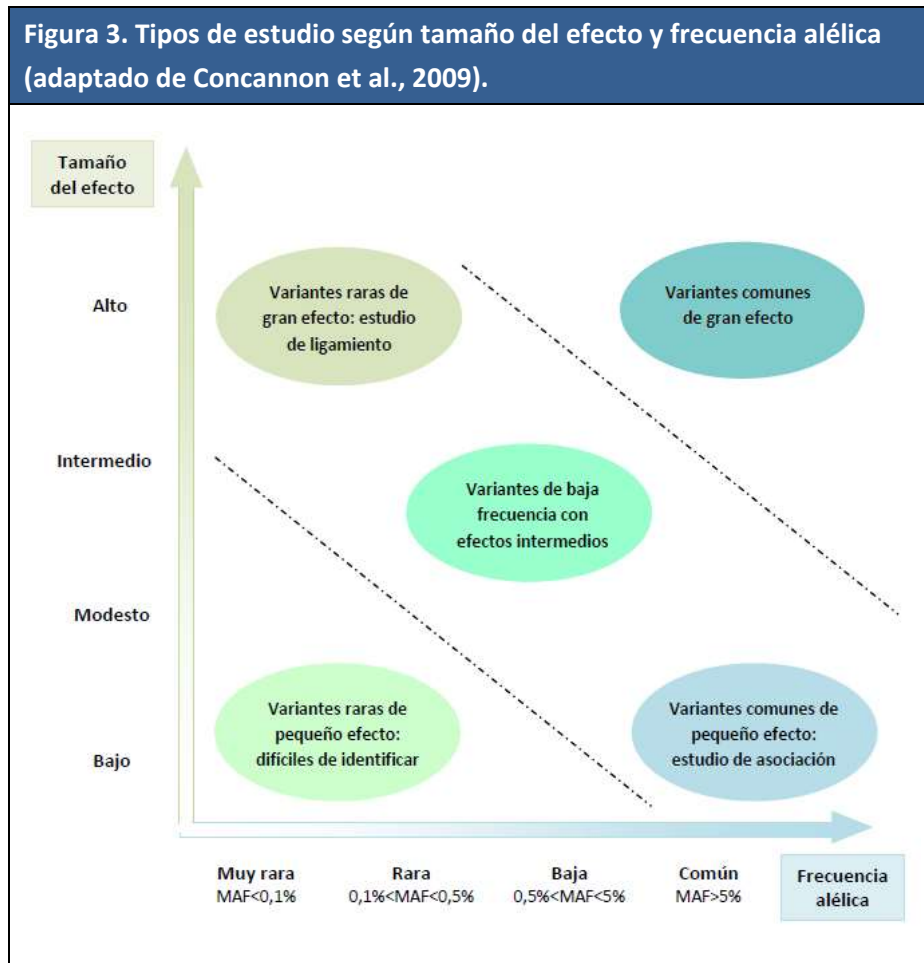
- (1) el alelo tiene una influencia directa sobre la enfermedad a estudio;
- (2) el alelo está en desequilibrio de ligamiento (*linkage disequilibrium*) con el alelo que predispone para dicha enfermedad, es decir, el alelo causante del fenómeno está físicamente cercano al alelo en estudio;
- (3) hay una mezcla poblacional, ya que en una población con varios grupos étnicos cualquier fenotipo común a un grupo étnico resultará en una asociación positiva con cualquier alelo que también sea más frecuente en dicho grupo. Para evitar estas asociaciones espurias se recomienda seleccionar poblaciones relativamente homogéneas o aparear los casos con controles de la misma etnia y preferiblemente de la misma zona geográfica.

Por lo general, los estudios de ligamiento serían mejores para identificar alelos de baja frecuencia con tamaños del efecto grandes, mientras que los estudios de asociación tendrían más poder para identificar variantes comunes con efectos bajos (Risch & Merikangas, 1996) (Figura 3). Por tanto, en el caso de las enfermedades mentales a priori serían más útiles los estudios de asociación, pues se cree que en cada enfermedad habría muchos genes implicados con efectos individuales muy pequeños ( $O.R. < 2$ ), los cuales podrían actuar de forma independiente o interaccionando necesariamente con otros genes o factores ambientales, y asociarse con la enfermedad o con subtipos específicos (Burmeister, McInnis, & Zöllner, 2008).

Desde mediados de los 90 este tipo de estudios han sido los predominantes en genética en psiquiatría, inicialmente basados en genes candidatos y más recientemente en el genoma completo. Los estudios de asociación del genoma completo (en inglés GWAS, de *genome-wide association study*) vendrían a ser lo contrario de los estudios de genes candidatos, puesto que el GWAS analiza cientos de miles de variantes comunes, lo que permite la detección de variantes que *a priori* no se habría planteado su asociación con la enfermedad.

Los estudios de asociación no han logrado encontrar variantes genéticas asociadas de forma consistente con ninguna enfermedad psiquiátrica. Tampoco los GWAS han conseguido por el momento resultados espectaculares, pero sí se están empezando a replicar algunos resultados

al aumentar el tamaño de las muestras (Kendler, 2013). Por ejemplo, en el primer trabajo importante del *Psychiatric GWAS Consortium (PGC) Schizophrenia group* (Ripke et al., 2013), 81 de los SNPs más significativos de la muestra primaria (9394 casos y 12462 controles) fueron significativos en una amplia muestra de replicación (8442 casos y 29839 controles). Ídem en el caso del trastorno bipolar (*Psychiatric GWAS Consortium Bipolar Disorder Working Group*, 2011).



### 1.3.2. Estudios genéticos en el TLP

Como en el resto de patologías psiquiátricas, la hipótesis de un posible componente genético en el TLP se planteó a partir de los resultados de los estudios de agregación familiar. Una vez confirmada la heredabilidad del trastorno con los estudios de gemelos, emergió el interés en intentar dilucidar qué genes concretos podrían estar implicados en la etiopatogenia del TLP, lo que ha propiciado la aparición, en los últimos 15 años, de varios estudios de asociación de genes candidatos. Tal y como indican las revisiones y meta-análisis al respecto (Amad et al.,

2014; Calati, Gressier, Balestri, & Serretti, 2013), los resultados de dichos estudios han sido, hasta la fecha, poco concluyentes. Cabe decir, sin embargo, que la mayoría de estudios de asociación en el TLP han empleado muestras muy pequeñas, de menos de 200 casos. Esto, unido al hecho de que cada estudio ha analizado muy pocos polimorfismos, y que la sospecha en los trastornos poligénicos es que cada variación genética explicaría una parte muy pequeña del efecto, posiblemente ha contribuido a la ausencia de resultados concluyentes. En los últimos años, además, la tendencia ha sido a incorporar también el componente ambiental en los estudios de genética, de acuerdo con la hipótesis gen-ambiente de la enfermedad mental. Estos estudios parecen estar dando algún resultado positivo, pero aún es muy temprano para extraer conclusiones definitivas al respecto. Así, en resumen, de los estudios de genética en el TLP se podría concluir que los datos parecen indicar que el TLP es un trastorno heredable, del cual todavía desconocemos qué genes estarían implicados, y que el papel de dichos genes en la etiología del trastorno estaría modulado por la exposición a ciertos factores ambientales.

En los siguientes apartados se explicarán más en detalle los diferentes estudios de genética en el TLP. Los trabajos que incluyen también un componente ambiental se expondrán en el apartado 1.4.

#### **1.3.2.1. Estudios de agregación familiar**

Estos estudios mostraron que el riesgo de presentar TLP era mayor en familiares de sujetos con TLP, y oscilaba entre 5,1 (Baron, Gruen, Asnis, & Lord, 1985) y 22,2 (Riso, Klein, Anderson, & Ouimette, 2000). Sólo un estudio mostró un riesgo inferior a 1 (Pope, Jonas, Hudson, Cohen, & Gunderson, 1983), aunque en este caso el diagnóstico de TLP se efectuó mediante revisión del historial médico y no mediante entrevista clínica. El principal problema de todos estos estudios son sus déficits metodológicos, entre ellos el uso de métodos de muestreo dudosos, tamaños de muestra pequeños o métodos diagnósticos variados. Así, por ejemplo, la evaluación clínica de casos y familiares varía en función del estudio, pudiendo efectuarse mediante revisión del historial médico (Loranger, Oldham, & Tulis, 1982; Pope et al., 1983), autoinformado (Reich, 1989) o por entrevistas estructuradas (Bandelow et al., 2005; Baron et al., 1985; Johnson et al., 1995; Links, Steiner, & Huxley, 1988; Riso et al., 2000; Stone, Kahn, & Flye, 1981; Zanarini, Gunderson, Marino, Schwartz, & Frankenburg, 1988).

Un estudio mucho más reciente que ha intentado solventar estas limitaciones metodológicas empleando una amplia muestra de casos, controles y familiares (132 sujetos con TLP, 134 sin



TLP, 102 con depresión mayor y 885 familiares), y evaluándolos mediante entrevistas diagnósticas estructuradas, ha confirmado la presencia de agregación familiar del TLP, puesto que el riesgo de diagnóstico de TLP fue 3,9 veces superior en los familiares de casos con TLP (14,1% vs. 4.9%,  $p < 0.001$ ) (Gunderson et al., 2011b).

#### **1.3.2.2. Estudios de gemelos**

Aunque los primeros estudios de gemelos en TLP o no apoyaban la heredabilidad del trastorno (Torgersen, 1984) o describían una heredabilidad de casi el 70% (Torgersen et al., 2000), estudios posteriores con muestras mucho más grandes, de un mínimo de 1000 gemelos, han estimado una heredabilidad media de aproximadamente el 40% (Amad et al., 2014). Así, dos estudios en 2794 y 1386 gemelos de la población general, evaluados con la *Structured Interview for DSM-IV Personality Disorder* (SIDP-IV), mostraron heredabilidades del 37,1% (Kendler et al., 2008) y 35% (Torgersen et al., 2008), respectivamente. Otro estudio con 2801 gemelos que empleaba la misma entrevista diagnóstica estimó una heredabilidad en torno al 35% para los rasgos TLP (Reichborn-Kjennerud et al, 2010). Con otras entrevistas diagnósticas se han obtenido resultados similares, con heredabilidades del 42% (Distel et al., 2008b) y del 30-50% (Bornovalova, Hicks, Iacono, & McGue, 2009). Un estudio más reciente, con 2800 gemelos diagnosticados mediante un cuestionario autoinformado y la SIDP-IV, ha estimado una heredabilidad cercana al 67% (Torgersen et al., 2012).

#### **1.3.2.3. Estudios de ligamiento**

Hasta la fecha únicamente se ha publicado un estudio de ligamiento en el TLP. En dicho estudio, que incluyó 711 pares de hermanos (300 DZ varones y hermanos y 510 DZ mujeres y hermanas) y 561 padres, vieron evidencia de ligamiento con rasgos TLP en los cromosomas 4, 9 y 18, aunque de los tres el que mostró un mayor ligamiento fue el cromosoma 9. A partir de estos datos, los autores dedujeron que el cromosoma 9 es el mejor candidato para incluir genes implicados en el desarrollo de rasgos TLP (Distel, Hottenga, Trull, & Boomsma, 2008a). Curiosamente, posteriormente no se han hecho estudios de asociación con genes candidatos de este cromosoma.

#### **1.3.2.4. Estudios de asociación**

La mayoría de los estudios de asociación en sujetos con TLP han sido a partir de genes candidatos de los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico (Tabla 3), puesto que se han

sugerido alteraciones de estos sistemas en el trastorno (Skodol et al., 2002). Por el momento sólo se ha publicado un GWAS, y no en el TLP sino en rasgos de personalidad límites. Los resultados de los estudios de genes candidatos se han recopilado en 2 exhaustivas revisiones (Amad et al. 2014; Calati et al., 2013), en las cuales se realizó también meta-análisis en aquellos casos en que había un mínimo de estudios para el mismo polimorfismo (dos estudios en la revisión de Amad y colaboradores; tres estudios en la de Calati y colaboradores). Como veremos a continuación con más detalle, no se han encontrado resultados concluyentes para ninguno de los polimorfismos estudiados.

En el sistema serotoninérgico se ha explorado la presencia de polimorfismos de riesgo en genes como el transportador de serotonina (*SCL6A4*) (Lyons-Ruth et al., 2007; Maurex, Zaboli, Ohman, Asberg, & Leopardi, 2010; Ni et al., 2006b; Pascual et al., 2007, 2008; Tadic et al., 2009b, 2010), los receptores de serotonina (*HTR*) (Ni et al., 2006a; Ni, Chan, Chan, McMain, & Kennedy, 2009; Tadic et al., 2009a; Zetsche et al., 2008), la triptófano hidroxilasa I (*TPH1*) (Ni et al., 2009; Wilson et al., 2009, 2012; Zaboli et al., 2006) y la triptófano hidroxilasa II (*TPH2*) (Ni et al., 2009; Perez-Rodriguez et al., 2010). La mayor parte de los estudios no encontraron asociaciones entre TLP y variantes de estos genes serotoninérgicos, resultado confirmado mediante meta-análisis para los genes *SLC6A4* (polimorfismos 5-HTTLPR y STin2 VNTR) y *TPH1* (variante rs1800532). Sí hubo resultados positivos para los genes *TPH2* (variante rs2171363) y *HTR2C* (variante rs6318), aunque por el momento no es posible extraer conclusiones específicas por el escaso número de estudios. Con el gen *SCL6A4* se vieron asociaciones entre variantes alélicas y rasgos caracteriales o síntomas del trastorno (Lyons-Ruth et al., 2007; Maurex et al., 2010).

En cuanto al sistema dopaminérgico, se han explorado el transportador de dopamina (*SLC6A3*) (Joyce et al., 2006, 2009; Nemoda et al., 2010), los receptores de dopamina (Nemoda et al., 2010), la tirosina hidroxilasa (Tadic et al., 2010) y la DOPA descarboxilasa (Mobascher et al., 2014). Como en el caso de los genes serotoninérgicos, los resultados de estos estudios no son concluyentes.

También se han examinado las enzimas encargadas de la degradación de las monoaminas, en concreto la monoamino oxidasa A (*MAO-A*) (Ni et al., 2007) y la catecol-O-metiltransferasa (*COMT*) (Lazzaretti et al., 2013; Nemoda et al., 2010; Tadic et al., 2009b).

Otros genes investigados han sido el factor neurotrófico derivado del cerebro (*BDNF*) (Tadic et al., 2009a), el gen *SCN9A* – que codifica para un canal de sodio de neuronas hipocampales - (Tadic et al., 2008), el receptor 1A de arginina-vasopresina (Vogel et al., 2012) y el *NRXN3* – molécula de adhesión celular - (Panagopoulos et al., 2013), así como tres genes asociados con el Trastorno Bipolar (Witt et al., 2014).

También se han estudiado interacciones entre genes, tanto serotoninérgicos (Ni et al., 2009; Tadic et al., 2010), como serotoninérgicos con dopaminérgicos (Tadic et al., 2009b) y serotoninérgicos con *BDNF* (Tadic et al., 2009a) (Tabla 3). Se han descrito asociaciones entre variantes de los genes *TPH2* y *HTR2C*, y de los genes *TPH2*, *HTR2C*, *5-HTT* y *MAOA*, con el TLP, pero estos resultados aún no han sido replicados.

Hasta la fecha no se han realizado GWAS en el TLP, pero sí ha aparecido recientemente un GWAS en población general con rasgos límites de la personalidad (Lubke et al., 2014), evaluados mediante la escala autoaplicada PAI-BOR (*Personality Assessment Inventory-Borderline Features*). En dos cohortes holandesas (N= 7125) se vio una asociación con el gen que codifica para la proteína *SERINC5*, en el cromosoma 5, proteína implicada en la mielinización. Este resultado fue replicado en una tercera cohorte holandesa independiente (N= 1301).

La ausencia de resultados firmes en los estudios de asociación con genes candidatos en el TLP podría deberse a varios motivos (Amad et al., 2014). En primer lugar, al tamaño reducido de las muestras, que en la mayoría de los casos son inferiores a 200 individuos. En segundo lugar, a la elevada heterogeneidad sintomática del trastorno, con diferentes genes implicados en los diversos síntomas. En tercer lugar, a la alta comorbilidad con otras entidades tanto de eje I como de eje II, en las cuales podrían estar implicados otros genes. En cuarto lugar, a las diferencias metodológicas entre los diversos estudios, por ejemplo, en cuanto a criterios de inclusión o de exclusión. Y finalmente, a la probable implicación de factores ambientales, tanto mediante procesos de interacción como de correlación. Por ello, la tendencia natural de estos últimos años ha sido a ir incorporando los factores ambientales en los estudios de genética. A continuación los veremos con mayor detalle.

Tabla 3. Estudios de asociación en el TLP.					
GEN	AUTORES	POLIMORFISMOS	MUESTRA (M/H)	ETNIA	RESULTADOS
<b>SISTEMA SEROTONINÉRGICO</b>					
<b>Transportador de serotonina (SCL6A4)</b>	Tadic et al., 2010	5-HTTLPR (S/L <sub>A</sub> /L <sub>G</sub> ), rs25531, STin2	156 TLP (108/48) 152 controles (106/46)	Caucásica	No asociación
	Ni et al., 2006b	5-HTTLPR (S/ L <sub>A</sub> /L <sub>G</sub> ), rs25531, STin2	89 TLP (76/13) 269 controles (141/128)	Caucásica	STin2: TLP mayores niveles de VNTR 10 repeticiones y menores de 12 repeticiones Haplotipos: TLP más S-10 y menos L <sub>A</sub> -12
	Pascual et al., 2007	5-HTTLPR (S/L), STin2	65 TLP (55/10)	Caucásica	5-HTTLPR: portadores de L bajas puntuaciones en subescala "gusto por fiestas y amigos" del ZKPQ STin2: 10 repeticiones bajas puntuaciones en "impulsividad", "búsqueda de sensaciones" y "gusto por fiestas y amigos"
	Lyons-Ruth et al., 2007	5-HTTLPR (S/L)	34 casos con rasgos TLP o antisociales (≥2 rasgos) 62 controles	Casos: 28 caucásica y 6 afro-americana Controles: 42 caucásica y 20 afro-americana	Nº alelos S asociado con incidencia de rasgos límites o antisociales
	Pascual et al., 2008	5-HTTLPR (S/L), STin2	86 TLP 100 controles	Caucásica	No asociación
	Maurex et al., 2010	5-HTTLPR (S/L)	77 TLP (77/0)	Caucásica	S/S más síntomas límites, depresivos, ansiosos y obsesivo-compulsivos, pero no más autoagresividad, que portadoras de alelo L
	Tadic et al., 2009b	5-HTTLPR (S/L)	161 TLP (112/49) 156 controles (110/46)	Caucásica	No asociación
<b>Receptor de serotonina 1A (HTR1A)</b>	Ni et al., 2009	rs6295, rs878567, rs749099, rs1364043	113 TLP (95/18) 113 controles (95/18)	Caucásica	No asociación
	Zetsche et al., 2008	rs6295	25 TLP (25/0) 25 controles (25/0)	N/D	Portadoras de G volumen amígdala menor que C/C

	Joyce et al., 2014	rs6295	50 TLP + TDM (34/16) 317 TDM (202/115)	Sujetos de Nueva Zelanda, de origen europeo	G/G se asocia con TLP (no significativo al ajustar por edad y SNPs DAT1)
<b>Receptor de serotonina 1B (HTR1B)</b>	Ni et al., 2009	rs1213371, rs11568817, rs130058, rs6296, rs6297	113 TLP (95/18) 113 controles (95/18)	Caucásica	No asociación
	Tadic et al., 2009a	rs11568817, rs130058, rs6296, rs6297	161 casos (112/49) 156 controles (110/46)	Caucásica	No asociación
<b>Receptor de serotonina 1D (HTR1D)</b>	Ni et al., 2009	rs674386, rs6300, rs604030	113 TLP (95/18) 113 controles (95/18)	Caucásica	No asociación
<b>Receptor de serotonina 2A (HTR2A)</b>	Ni et al., 2006a	rs6313, rs4941573, rs2296972, rs6314	111 TLP (93/18) 287 controles (152/135)	Caucásica	No asociación con TLP, pero rs6313A y rs4941573A se asocian con "extraversión" de NEO-PI-R en sujetos con TLP
<b>Receptor de serotonina 2C (HTR2C)</b>	Ni et al., 2009	VNTR, rs6318	113 TLP (95/18) 113 controles (95/18)	Caucásica	TLP asociación con rs6318G y con genotipo rs6318G/G
<b>Receptor de serotonina 3A (HTR3A)</b>	Ni et al., 2009	rs1062613, rs1176719, rs948983	113 TLP (95/18) 113 controles (95/18)	Caucásica	No asociación
<b>Triptófano hidroxilasa 1 (TPH1)</b>	Zaboli et al., 2006	rs4537731, rs684302, rs211105, rs1800532, rs1799913, rs7933505	95 TLP con al menos 2 tentativas autolíticas (95/0) 98 controles (98/0)	Caucásica	Asociación con varios haplotipos
	Wilson et al., 2009	rs1800532	100 TLP + TA (81/19) 101 controles (62/39)	Casos: 78% caucásica no hispana, 22% hispana Controles: 87,1% caucásica no hispana, 12,9% hispana	TLP asociación con alelo A, independientemente de la conducta suicida
	Wilson et al., 2012	rs4537731, rs1800532	98 TLP + TA (81/17) 300 TA (190/110)	Casos: 79,6% caucásica no hispana, 20,4% hispana Controles: 80,7% caucásica no hispana, 19,4% hispana	Asociación con alelo A
	Ni et al., 2009	rs7130929, rs1800532	113 TLP (95/18) 113 controles (95/18)	Caucásica	No asociación
<b>Triptófano hidroxilasa 2 (TPH2)</b>	Ni et al., 2009	rs4570625, rs11178997, rs10784941, rs1843809, rs1386494, rs2171363, rs1487280, rs1872824	113 TLP (95/18) 113 controles (95/18)	Caucásica	TLP asociación con rs2171363T y con los genotipos que contienen el alelo T, y con rs10784941 y genotipos que contienen G

## Introducción

	Pérez-Rodríguez et al., 2010	Haplotipo GGTG (rs2171363, rs1386491, rs6582078, rs1352250)	109 TLP 142 otros TP 103 controles (135 mujeres, 219 hombres)	51,4% blanca europea 22,9% negra 16,7% hispana 8,2% asiática 0,6% mezcla 0,3% india	TLP asociación con haplotipo
<b>SISTEMA DOPAMINÉRGICO</b>					
<b>Transportador de dopamina (SLC6A3)</b>	Joyce et al., 2006	Alelo 9-10 repeticiones	22 TLP + TA y 135 TA 21 TLP + TA y 157 TA	≥95% caucásica	Asociación
	Joyce et al., 2009	Alelo 9-10 repeticiones	Depresivos y familiares de 1º grado, con varios diagnósticos (N=512; 67,8% mujeres; 22 TLP+TA)	N/D	No asociación
	Nemoda et al., 2010	40bp VNTR	Muestra 1: 99 sujetos de familias con pocos ingresos (59/40) Muestra: 136 TA (104/32)	Muestra 1: 66 caucásica, 26 uno o dos progenitores afro-americanos, 7 uno o dos progenitores hispanos Muestra 2: caucásica	No asociación
	Joyce et al., 2014	Alelo de 9-10 repeticiones	50 TLP + TDM (34/16) 317 TDM (202/115)	Sujetos de Nueva Zelanda, de origen europeo	Genotipo 9,10 se asocia con TLP
<b>Receptores de dopamina</b>	Nemoda et al., 2010	DRD2: TaqIA=rs1800497, TaqIB=rs1079597, TaqID=rs1800498 DRD4: 48bp VNTR	Muestra 1: 99 sujetos de familias con pocos ingresos 136 TA	Muestra 1: 66 caucásica, 26 uno o dos progenitores afro-americanos, 7 uno o dos progenitores hispanos Muestra 2: caucásica	Rasgos TLP asociación con DRD2 TaqIA1, TaqIB1 y DRD4-616CC (sólo éste se replicó en muestra independiente)
<b>Tirosinhidroxilasa (TH)</b>	Tadic et al., 2010	Val81Met	156 TLP (108/48) 152 controles (106/46)	Caucásica	No asociación
<b>DOPA descarboxilasa</b>	Mobascher et al., 2014	rs2060762, rs4947535, rs3757472, rs12718541, rs1451371, rs4947584, rs1470750, rs3735273, rs12666409	987 TLP (893/94) 1110 controles (868/242)	Caucásica	TLP asociación con rs12718541G
<b>ENZIMAS DE DEGRADACIÓN DE LAS MONOAMINAS</b>					
<b>Monoamino oxidasa A (MAO-A)</b>	Ni et al., 2007	VNTR en el promotor y rs6323	111 TLP 289 controles	Caucásica	Asociación con VNTR

<b>Catecol-O-metiltransferasa (COMT)</b>	Tadic et al., 2009b	Val158Met (=rs4680)	161 TLP (112/49) 156 controles (110/46)	Caucásica	TLP asociación con Met158Met
	Nemoda et al., 2010	Val158Met (=rs4680)	99 sujetos de familias con pocos ingresos 136 TA	66 caucásica 26 uno o dos progenitores afro-americanos 7 uno o dos progenitores hispanos	No asociación
	Lazzaretti et al., 2013	Val158Met (=rs4680)	19 TLP 36 controles	Caucásica	TLP asociación con alelo Met158
<b>OTROS</b>					
<b>Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)</b>	Tadic et al., 2009a	rs6265	161 TLP (112/49) 156 controles (110/46)	Caucásica	No asociación
<b>SCN9A</b>	Tadic et al., 2008	rs16851799, rs7607967, rs4371369, rs4453709, rs4597545, rs4387806, rs6754031, rs12620053, rs13017637, rs12994338, rs4447616	161 TLP (112/49) 156 controles (110/46)	Caucásica	No asociación
<b>Receptor 1A de arginina-vasopresina (AVRP1A)</b>	Vogel et al., 2012	AVR, RS1, RS3	161 TLP (112/49) 157 controles (110/47)	Caucásica	No asociación
<b>NRXN3</b>	Panagopoulos et al., 2013	23 SNPs	1439 dependientes de heroína (563/876) 507 controles (281/226)	Caucásica y asiática	No asociación con rasgos TLP
<b>Genes asociados con Trastorno bipolar en GWAS</b>	Witt et al., 2014	CACNA1C: rs1006737, rs4765913. ANK3: rs10994336, rs10994397. ODZ4: rs12576775.	673 TLP (612/61) 748 controles (411/337)	Caucásica	TLP asociación con CACNA1C rs1006737
<b>INTERACCIONES ENTRE GENES</b>					
<b>5-HTTLPR, COMT</b>	Tadic et al., 2009b	5-HTTLPR (S/L) COMT: Val158Met (=rs4680)	161 TLP (112/49) 156 controles (110/46)	Caucásica	COMT Met158Met más frecuente en TLP con al menos un alelo S
<b>HTR1B, BDNF</b>	Tadic et al., 2009a	HTR1B: rs11568817, rs130058, rs6296, rs6297 BDNF: rs6265	161 TLP (112/49) 156 controles (110/46)	Caucásica	TLP sobre-representación de BDNF 196A en portadores de HTR1B A-161
<b>5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT2C, 5-HT3A, TPH1, TPH2, 5-HTT, 5-HT2A, MAOA</b>	Ni et al., 2009	5-HT1A: rs6295, rs878567, rs749099, rs1364043 5-HT1B: rs1213371, rs11568817, rs130058, rs6296, rs6297	113 TLP (95/18) 113 controles (95/18)	Caucásica	TLP: interacciones entre 5-HT2C rs6318 y TPH2 rs2171363, y entre 5-HT2C rs6318, 5-HTT VNTR, MAOA VNTR y TPH2 rs2171363

**Introducción**

		<p>5-HT1D: rs674386, rs6300, rs604030            5-HT2A: rs6313, rs4941573, rs2296972, rs6314            5-HT2C: VNTR, rs6318            5-HT3A: rs1062613, rs1176719, rs948983            TPH1: rs7130929, rs1800532            TPH2: rs4570625, rs11178997, rs10784941, rs1843809, rs1386494, rs2171363, rs1487280, rs1872824            5-HTT: 5-HTTLPR (S/ L<sub>A</sub>/L<sub>G</sub>), rs25531, STin2            MAOA: VNTR en el promotor y rs6323</p>			Pacientes con 5-HT2C rs6318G/G mayor frecuencia de TPH2 rs2171363C/T que los controles
<b>SCL6A4, TH</b>	Tadic et al., 2010	<p>SCL6A4: 5-HTTLPR (S/L<sub>A</sub>/L<sub>G</sub>), rs25531, STin2            TH: Val81Met</p>	<p>156 TLP (108/48)            152 controles (106/46)</p>	Caucásica	No interacciones significativas
<b>HTR1A, DAT1</b>	Joyce et al., 2014	<p>HTR1A: rs6295            DAT1: alelo de 9-10 repeticiones</p>	<p>50 TLP + TDM (34/16)            317 TDM (202/115)</p>	Sujetos de Nueva Zelanda, de origen europeo	No interacciones significativas
<p><b>5-HTTLPR:</b> región polimórfica del promotor del transportador de serotonina; <b>ANK3:</b> gen de la ankirina 3, proteína de membrana del sistema nervioso; <b>bp:</b> pares de bases de ADN; <b>CACNA1C:</b> gen que codifica para el canal de calcio dependiente de voltaje, tipo L, subunidad alfa 1C; <b>DAT1:</b> transportador de dopamina; <b>DRD2:</b> gen del receptor de dopamina D2; <b>DRD4:</b> gen del receptor de dopamina D4; <b>M/H:</b> mujeres/hombres; <b>N/D:</b> no disponible; <b>NEO-PI-R:</b> NEO Personality Inventory Revised; <b>NRXN3:</b> gen que codifica para la neurexina 3, molécula de adhesión celular; <b>ODZ4:</b> gen que codifica para la teneurina 4, proteína de membrana; <b>RS1 y RS3:</b> polimorfismos del receptor 1A de arginina-vasopresina; <b>SCN9A:</b> gen que codifica para un canal de sodio de neuronas hipocámpales; <b>STin2:</b> VNTR en el intrón 2 del transportador de serotonina; <b>TA:</b> trastorno afectivo; <b>TDM:</b> trastorno depresivo mayor; <b>TP:</b> trastorno de personalidad; <b>VNTR:</b> número variable de repeticiones en tándem; <b>ZKPQ:</b> Zuckerman-Kuhlman Personality Questionnaire.</p>					



#### 1.4. HIPÓTESIS GEN-AMBIENTE EN EL TLP

Como hemos visto en apartados anteriores, parece que la exposición a factores ambientales adversos durante la infancia podría asociarse con el desarrollo posterior de psicopatología, como el TLP. No obstante, no siempre es así. Algunas revisiones han descrito que aproximadamente el 30% de las víctimas de abuso sexual no presentarán problemas psiquiátricos en la edad adulta (Fergusson & Mullen, 1999). Hay incluso datos más optimistas. Spataro et al. (2004) observaron que sólo el 12,4% de los sujetos que habían sufrido abuso sexual infantil pedían tratamiento psiquiátrico posteriormente y Collishaw et al. (2007) que el 44,5% de una muestra de niños abusados no referían psicopatología durante los 30 años siguientes. En el caso concreto del TLP, se ha descrito que sólo el 14,9% de los niños con traumas infantiles cumplirían criterios para TLP en la edad adulta (Widom et al., 2009). Además, aunque sí parece existir una asociación entre traumas infantiles y TLP, los traumas sólo explicarían una parte de la variancia; por ejemplo, según los resultados de un meta-análisis, entre abuso sexual infantil y TLP habría una correlación del 0,279 (Fossati, Madeddu, & Maffei, 1999). Esto sugiere que podría haber otros factores implicados en la asociación entre traumas infantiles y psicopatología.

Pero no sólo la exposición a traumas infantiles no siempre conlleva el desarrollo de psicopatología, sino que incluso se ha propuesto que puede ayudarnos a ser más resilientes. A partir de la observación de que, en ratas, la exposición intermitente a estrés temprano propicia que se responda más eficazmente al ser expuesto a situaciones nuevas (Levine, 1962) surge la hipótesis de *stress inoculation-induced resilience*, posteriormente apoyada por varios estudios en humanos, primates y roedores (Boyce & Ellis, 2005).

¿De qué depende, entonces, que un individuo que ha sufrido experiencias adversas en la infancia acabe desarrollando o no psicopatología? Las hipótesis actuales sostienen que, principalmente, de que exista una vulnerabilidad genética (modelo de diátesis-estrés). Este modelo ha sido comprobado en estudios con roedores, en que se ha visto que si se seleccionan grupos de ratas según rasgos genéticos concretos, la misma adversidad temprana puede tener diversas consecuencias (de Kloet et al., 2005). En humanos, el grupo pionero en comprobar esta hipótesis fue el de Caspi y colaboradores. Con sus experimentos han descrito, por ejemplo, que un polimorfismo de la MAO-A modula la asociación entre maltrato infantil y conductas antisociales en la edad adulta (Caspi et al., 2002) o que la asociación entre sucesos

vitales y el alelo corto del promotor del transportador de serotonina se relaciona con episodios depresivos o ideación autolítica (Caspi et al., 2003).

Dada la demostrada repercusión de los sucesos traumáticos infantiles en la función de los sistemas de respuesta al estrés, también se ha estudiado la interacción gen-ambiente en genes de estos sistemas. Por ejemplo, se ha visto que varios SNPs del gen *CRHR1* modifican el riesgo para depresión en el adulto en aquellos sujetos que han sufrido algún tipo de trauma en la infancia (Bradley et al., 2008; Grabe et al., 2010) o que la interacción entre variantes del gen *FKBP5* y los antecedentes de traumas infantiles aumentaría el riesgo en la edad adulta para TEPT (Binder et al., 2008; Xie et al., 2010) o depresión (Appel et al., 2011).

Como veremos en el siguiente apartado, en los últimos años se han llevado a cabo varios estudios para intentar descubrir variantes genéticas que, en interacción con sucesos ambientales adversos, puedan aumentar el riesgo para desarrollar TLP. Avanzamos ya que, por sorprendente que parezca, ninguno de estos estudios se ha centrado en genes de los sistemas de respuesta al estrés.

Los genes y el ambiente también pueden interaccionar de otra forma que se ha denominado “correlación gen-ambiente” (rGE). Según este modelo, la exposición a condiciones ambientales depende del genotipo. Se han descrito 3 tipos de correlación gen-ambiente (Plomin, DeFries, & Loehlin, 1977): evocativa, activa y pasiva. En el caso concreto de la relación entre maltrato infantil y psicopatología, la correlación evocativa tendría lugar cuando las características genéticamente determinadas del niño evocan respuestas del entorno, como el maltrato parental. La correlación activa sucede cuando la persona elige ambientes, como por ejemplo grupos de amigos, que están relacionados con sus características determinadas genéticamente, como la impulsividad. La correlación pasiva se da cuando tanto la tendencia de los padres a cuidar a sus hijos de una determinada manera como la vulnerabilidad de los hijos para comportarse de una forma concreta están influenciadas por una vulnerabilidad heredable común a padres e hijos (por ejemplo, una vulnerabilidad genética para la conducta antisocial predispondría a los padres a maltratar a sus hijos y llevaría a los hijos a desarrollar problemas de conducta). Varias teorías de la etiología del maltrato plantean que ciertas cualidades de los niños, como la edad, la salud, las conductas disruptivas, la prematuridad o las dificultades o retraso del desarrollo, influyen en la probabilidad de que los cuidadores les maltraten (Belsky, 1993; Vasta, 1982), propuesta respaldada por diversos estudios de adopción (Ge et al., 1996;

O'Connor, Deater-Deckard, Fulker, Rutter, & Plomin, 1998). La presencia de rGE también ha sido explorada en el TLP, como veremos en el siguiente apartado.

En los últimos años se ha descrito que los sucesos ambientales no sólo interaccionan con genes que nos vienen "de serie", sino que pueden modificar la expresión de algunos genes a través de mecanismos epigenéticos, y de esta forma conferir un mayor riesgo de desarrollar psicopatología. Estos mecanismos epigenéticos controlan la expresión de los genes sin cambiar su secuencia. Uno de ellos es la metilación de ADN, que consiste en añadir grupos metilo a los residuos de citosina, generalmente en las denominadas "islas CpG". Estas islas son zonas del ADN muy ricas en residuos de citosina y guanina que suelen contener secuencias de inicio de la transcripción y promotores. Al metilar las bases de citosina, se impide que proteínas necesarias para la transcripción de genes se unan al ADN y, por consiguiente, se bloquea la transcripción de ese gen.

Además de la metilación del ADN, hay otros mecanismos epigenéticos de control de la transcripción. Uno de ellos es la modificación de las histonas, de tal forma que la metilación de un residuo de lisina en la histona H3 actúa como señal de represión de la transcripción y la acetilación de dichos residuos como señal de activación. Otro mecanismo de regulación epigenética son las partículas de microARN, las cuales se unen al ARNm impidiendo su traducción en proteínas.

El estudio preclínico más famoso que demostró que los sucesos traumáticos tempranos podían alterar la metilación de genes del eje HHA (concretamente del receptor de glucocorticoides [GR]) y ésta, a su vez, el funcionamiento del eje, es el de Weaver y colaboradores (2004). Basándose en los estudios que habían descrito que las crías de madres cuidadoras en comparación con las poco cuidadoras mostraban un aumento de la expresión hipocampal de GR así como unas respuestas del eje HHA al estrés más moderadas (Caldji et al., 1998; Levine, 1994; Liu et al., 1997), testaron la hipótesis de que el cuidado materno alteraría la metilación de ADN del promotor del exón 1<sub>7</sub> del gen del GR, y que estos cambios se mantendrían de forma estable en la edad adulta y se asociarían con diferencias en la expresión de dicho receptor y en la respuesta del eje al estrés. Vieron diferencias significativas en la metilación de islas específicas del promotor, de tal forma que las crías de madres poco cuidadoras tenían una mayor metilación. También mostraban una mayor metilación las crías de madres muy cuidadoras si eran criadas por madres poco cuidadoras, lo que sugería que el patrón de

metilación era más ambiental que heredado. Al aplicar a las crías de madres poco cuidadoras un inhibidor de la metilación denominado tricostatina A, aumentaba la expresión de GR hipocampal hasta alcanzar los niveles de las crías de madres cuidadoras, sugiriendo que la expresión de dicho gen estaba efectivamente regulada por la metilación, y se eliminaba el efecto materno en las respuestas del eje al estrés agudo. Así, en conclusión, los resultados de este estudio mostraban que factores ambientales tempranos pueden influir sobre el estado de metilación de este gen y que este estado es potencialmente reversible.

En humanos, se ha visto una mayor metilación del promotor del gen de GR (denominado también *NR3C1*) en niños expuestos a estrés materno durante el embarazo (Hompey et al., 2013; Mulligan, D'Errico, Stees, & Hughes, 2012; Oberlander et al., 2008; Radtke et al., 2011) y en víctimas de traumas infantiles (Labonte et al., 2012; McGowan et al., 2009; Tyrka, Price, Marsit, Walters, & Carpenter, 2012).

De entre todos estos trabajos, quizá el que tiene mayor interés es el de McGowan y colaboradores, pues se realizó directamente en tejido cerebral *postmortem*. Examinaron el estado de metilación del gen *NR3C1* en el hipocampo de víctimas de suicidio, comparando aquéllas que habían sufrido abusos sexuales en la infancia con las que no y con controles. En las víctimas de suicidio con antecedentes de abuso vieron que había una reducción de los niveles de ARNm del *NR3C1*, así como un aumento de la metilación del promotor del exón 1<sub>F</sub> (el homólogo humano del exón 1<sub>7</sub> en ratas). No había diferencias entre las víctimas de suicidio sin abusos y los controles.

Como veremos en el siguiente apartado, en sujetos con TLP también se ha descrito una mayor metilación de este receptor, así como de otros genes.

En resumen, vemos que toda la evidencia apunta hacia un control del desarrollo de las enfermedades mentales por la confluencia de factores genéticos y ambientales predisponentes. Dichos factores se pueden relacionar mediante procesos de interacción (tener un genotipo determinado y exponerse a un factor ambiental concreto confiere mayor riesgo de desarrollar una enfermedad), mediante procesos de correlación (tener un genotipo concreto predispone a exponerse a un factor ambiental de riesgo y, el cómputo de ambas cosas, aumenta la probabilidad de presentar la enfermedad) y mediante procesos epigenéticos (la exposición a un determinado factor ambiental condiciona la transcripción de determinados

genes que, al variar su expresión, pueden predisponer para desarrollar una enfermedad concreta). Entre las enfermedades mentales en que se han explorado relaciones genético-ambientales se encuentra el TLP, aunque esta vía de investigación está aún en fases iniciales. Veamos a continuación un resumen de los hallazgos obtenidos.

#### **1.4.1. Estudios de gemelos**

Los estudios de gemelos pueden ser ampliados incluyendo otros familiares, como padres, hermanos, consortes y descendencia, y eso permite estudiar también el papel de factores ambientales. Utilizando un diseño de este tipo, se ha visto que el modelo que mejor explica la presencia de TLP incluye factores tanto genéticos como ambientales individuales (es decir, factores ambientales específicos para cada individuo, no compartidos entre miembros de una misma familia) (Distel et al., 2009), y que en la etiología del TLP se darían tanto fenómenos de interacción como de correlación gen-ambiente (Bornovalova et al., 2009; Distel et al., 2011).

#### **1.4.2. Estudios de asociación**

Como sucede con los estudios puramente genéticos, los estudios de asociación que incluyen factores ambientales se han centrado también en los sistemas monoaminérgicos. Se han hallado varias asociaciones significativas, pero aún no han sido replicadas. Wagner y colaboradores han mostrado que el abuso sexual infantil modularía la asociación entre el alelo corto de un polimorfismo en la región promotora de *SCL6A4* y la impulsividad (Wagner, Baskaya, Lieb, Dahmen, & Tadić, 2009), entre el polimorfismo Val 66 Met del *BDNF* y la impulsividad (Wagner et al., 2010b) y entre la variante *COMT* Val 158 Met y la agresividad impulsiva (Wagner et al., 2010a). Sin embargo, no se ha observado una asociación entre este mismo polimorfismo de la *COMT* y factores ambientales en la impulsividad (Wagner et al., 2010c). También se ha descrito que variantes del gen *TPH1* modularían la asociación entre abuso infantil y el grado de TLP en la edad adulta (Wilson et al., 2012).

#### **1.4.3. Estudios de metilación**

Hasta la fecha se han publicado muy pocos estudios epigenéticos en el TLP. En concreto cuatro estudios, de los cuales tres se han centrado en genes específicos y otro se trata de un EWAS (del inglés *epigenome-wide association study*), también denominado metiloma.

Tres de estos estudios son del mismo grupo de investigación, de la universidad de Ginebra. En un primer estudio (Perroud et al., 2011), evaluaron la asociación entre traumas infantiles y aumento de metilación del promotor de *NR3C1* en una muestra de 101 sujetos con TLP, 99 sujetos con depresión mayor (TDM) y 15 sujetos con TDM y TEPT. Los resultados mostraron una correlación positiva entre abuso sexual, la gravedad del abuso, el número de tipos diferentes de maltrato y la metilación de *NR3C1*. En el grupo con TLP, tanto el abuso sexual como la negligencia física, así como el número de tipos diferentes de abuso y negligencia, se asociaron con unos mayores niveles de metilación. Además, los sujetos con TLP sin traumas infantiles tuvieron unos niveles de metilación más elevados que los sujetos con TDM, sugiriendo que el TLP podría estar, *per se*, ligado a un estado de metilación aumentado. En un segundo estudio (Perroud et al., 2013), evaluaron el estado de metilación del gen *BDNF* en una muestra de 115 sujetos con TLP en comparación con 52 controles sanos y vieron que los sujetos con TLP tenían una mayor metilación del gen, que a mayor número de traumas mayor metilación del gen y que en los sujetos con TLP el grado de metilación aumentó tras 4 semanas de psicoterapia dialéctico-conductual intensiva, a expensas principalmente de los sujetos no respondedores a la terapia. Cabe destacar que actualmente se está poniendo en duda la veracidad de estos resultados, puesto que se ha denunciado a unos de los autores por una posible manipulación de los datos sobre la metilación del gen *NR3C1* en un estudio en pacientes con trastorno bipolar (Aubry et al., 2014). En un tercer estudio de este grupo, en el cual no ha participado el autor denunciado, se ha realizado un EWAS comparando 96 sujetos con TLP y altos niveles de traumas infantiles y 93 sujetos con TDM y bajos niveles de traumas infantiles (Prados et al., 2015). Se han descrito diferencias en la metilación de diversos genes (*IL17RA*, *miR124-3*, *KCNQ2*, *EFNB1*, *OCA2*, *MFAP2*, *RPH3AL*, *WDR60*, *CST9L*, *EP400*, *A2ML1*, *NT5DC2*, *FAM163A* y *SPSB2*) al comparar o bien los sujetos con TLP respecto a los sujetos con TDM o bien en relación a la gravedad del trauma infantil.

Un cuarto estudio, de un grupo independiente, evaluó el grado de metilación de 14 genes neuropsiquiátricos en una muestra de 26 sujetos con TLP en comparación con 11 controles sanos (Dammann et al., 2011). Los genes evaluados fueron *COMT*, *DAT1*, *GABRA1*, *GNB3*, *GRIN2B*, *HTR1B*, *HTR2A*, *5-HTT*, *MAOA*, *MAOB*, *NOS1*, *NR3C1*, *TPH1* y *TH*. Se vio una mayor metilación en los sujetos con TLP en comparación con los controles en los genes *HTR2A*, *NR3C1*, *MAOA*, *MAOB* y *COMT*, sugiriendo que una alteración en la metilación de estos genes podría estar implicada en la etiología del TLP. Como vemos, estos resultados no coinciden con los obtenidos en el EWAS, pero hay que destacar que en un caso se ha comparado a los sujetos

con TLP con controles sanos y en el otro con sujetos con TDM, y eso podría explicar en parte la disparidad de resultados.

En resumen, hasta la fecha se han publicado muy pocos estudios en el TLP que evalúen procesos de interacción entre factores ambientales y genes concretos, y menos aún que investiguen el papel de genes implicados en la respuesta al estrés. Es, por tanto, un terreno que posiblemente merece más atención si se quiere llegar a dilucidar los mecanismos etiopatogénicos implicados en este trastorno.





---

# **Planteamiento, hipótesis y objetivos**

---



## 2.1. PLANTEAMIENTO DE LA TESIS DOCTORAL

Como se ha expuesto detalladamente a lo largo de la introducción, las hipótesis actuales sobre la etiopatogenia del TLP sostienen que este trastorno resultaría de la interacción entre factores genéticos y ambientales. Entre los factores ambientales destacan los antecedentes de sucesos traumáticos en la infancia, habiéndose demostrado su frecuente asociación con el TLP tanto en estudios retrospectivos como prospectivos, así como su influencia en la gravedad del trastorno. También ha quedado patente la heredabilidad del TLP en múltiples estudios de genética epidemiológica; sin embargo, los genes concretos implicados en su etiopatogenia se desconocen. En comparación con otros trastornos psiquiátricos, en el TLP se han llevado a cabo pocos estudios de asociación con genes candidatos y además, salvo alguna excepción reciente, con muestras muy pequeñas. Estos genes candidatos han sido principalmente de los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico, pues la clínica característica del TLP, con síntomas como la disregulación afectiva, la autoagresividad o las conductas impulsivas, es sugestiva de estar al menos en parte regulada por estos sistemas monoaminérgicos. Por el momento, para ninguno de los genes investigados se ha descrito una asociación clara con el TLP. Otro sistema que se cree implicado en la etiopatogenia del trastorno es el eje HHA, que es uno de los principales sistemas de respuesta del organismo al estrés. Se han descrito alteraciones del funcionamiento de este eje en sujetos con TLP, aunque hoy por hoy aún no está claro el sentido de las disfunciones y si éstas están mediadas o no por otros factores, como podrían ser los antecedentes de traumas en la infancia. De hecho, tanto estudios preclínicos como clínicos han mostrado que los traumas infantiles se asocian *per se* con disfunciones del eje HHA. Pese a su probable implicación en la etiopatogenia del TLP, hasta la fecha no se han realizado estudios genéticos de asociación con genes candidatos de este eje. Otro sistema involucrado en la respuesta del organismo al estrés es el sistema noradrenérgico, del cual, por el momento, sólo se ha investigado el papel en el TLP del gen de la COMT, enzima encargada también de la degradación de la dopamina.

Ante la sospecha de que los factores ambientales y los genéticos actuarían conjuntamente en el desarrollo del TLP, tímidamente han ido apareciendo en los últimos años algunos estudios que evalúan si los traumas infantiles modularían la asociación entre genes de los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico y el TLP o síntomas concretos del trastorno. Como en el caso de los estudios meramente genéticos, los resultados no han sido concluyentes, probablemente debido también en parte a que han sido pocos estudios con muestras muy pequeñas. Recientemente ha comenzado a explorarse en este trastorno un nuevo enfoque de la

interacción entre factores ambientales y genéticos, según el cual el ambiente podría modificar la expresión de determinados genes mediante procesos de metilación del ADN. Parece que uno de los genes que podría ser susceptible de esta regulación por los traumas infantiles es el del GR, tal y como se ha visto en algunos estudios en animales y humanos. En el TLP hay ciertos indicios de que la metilación de este gen podría diferir de la de los controles sanos.

Así pues, aunque la hipótesis actual es que en el desarrollo del TLP intervendrían tanto factores genéticos como ambientales, hasta la fecha hay muy pocos estudios que hayan evaluado esta hipótesis y menos aún que hayan investigado genes de los sistemas de respuesta al estrés, en especial del eje HHA. Tampoco se ha estudiado si esta interacción genético-ambiental podría influir sobre la gravedad del trastorno, pese a que a nivel individual sí se han descrito asociaciones. El estudio de la interacción entre los antecedentes de sucesos traumáticos en la infancia y genes de los sistemas de respuesta al estrés podría ayudar a entender mejor la etiología del TLP y, por tanto, a desarrollar estrategias preventivas o terapéuticas más eficaces que las disponibles actualmente.

## **2.2. HIPÓTESIS**

En base a lo expuesto anteriormente, en la presente tesis se plantean las siguientes hipótesis:

### **Hipótesis principal:**

· Existe una asociación entre variantes de genes de los sistemas de respuesta al estrés y el TLP, la cual está modulada por los antecedentes de traumas en la infancia.

### **Hipótesis secundarias:**

· En el TLP, los traumas infantiles se asocian con una mayor gravedad del trastorno. Dicha asociación puede estar influenciada por los rasgos temperamentales de los sujetos.

· En el TLP, los traumas infantiles no sólo modulan la asociación entre polimorfismos de riesgo y la enfermedad, sino que influyen sobre la expresión de algunos genes, en concreto del GR, mediante procesos de metilación del ADN.

· En el TLP, el grado de metilación del GR se asocia con una mayor gravedad del trastorno.

### 2.3. OBJETIVOS

**Objetivos principales:**

- Identificar asociaciones entre polimorfismos de genes de los sistemas de respuesta al estrés (eje HHA y sistema noradrenérgico) y el TLP.
- Evaluar la posible modulación de dichas asociaciones por los antecedentes de traumas en la infancia.

**Objetivos secundarios:**

- Evaluar si existe asociación entre los antecedentes de traumas en la infancia y la gravedad del trastorno en sujetos con TLP, y si dicha asociación está mediada por los rasgos temperamentales.
- Investigar la posible asociación entre los antecedentes de traumas en la infancia y el grado de metilación del GR en sujetos con TLP.
- Investigar si el grado de metilación del GR se asocia con una mayor gravedad del trastorno en sujetos con TLP.



---

## **Método**

---





A continuación se describe la metodología general de los trabajos que componen esta tesis. El material y método empleado en cada estudio se detalla en los correspondientes artículos originales incluidos en el apartado de Resultados.

### 3.1. DISEÑO

Los dos estudios que evalúan la hipótesis principal de la tesis son estudios genéticos de asociación con diseño analítico observacional de casos y controles.

Los estudios que evalúan las hipótesis secundarias son estudios analíticos observacionales.

### 3.2. SUJETOS DE ESTUDIO

Para alcanzar el objetivo principal de la tesis, se ha reclutado una muestra de 481 sujetos diagnosticados de TLP y 442 controles, todos ellos caucásicos de descendencia europea. El proceso de reclutamiento se ha realizado en tres hospitales de Barcelona entre 2002 y 2013, el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, el Hospital Universitari Vall d'Hebron y el Consorci Sanitari de l'Anoia, todos ellos con unidades específicas para el tratamiento ambulatorio de pacientes con TLP.

Los pacientes se han reclutado consecutivamente de entre todos los sujetos mayores de 18 años derivados a dichas unidades de TLP que cumplieran criterios diagnósticos para este trastorno y no presentaban los criterios de exclusión que se detallarán posteriormente. El diagnóstico de TLP se realizó mediante el uso de la versión validada al castellano de dos entrevistas semi-estructuradas, la SCID-II (del inglés, *Structured Clinical Interview for Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-IV (DSM-IV) Axis II Disorders*) (Gómez-Beneyto et al., 1994) y la DIB-R (del inglés, *Revised Diagnostic Interview for Borderlines*) (Barrachina et al., 2004). Los criterios de exclusión consistían en presencia en el momento de la evaluación de patología aguda de eje I (incluyendo dependencia de sustancias, salvo nicotina) o de patología orgánica grave (por ejemplo, síndrome orgánico cerebral, enfermedad neurológica o retraso mental), así como no obtención del consentimiento informado por escrito. Dada la elevada comorbilidad del TLP con otros trastornos psiquiátricos (Leichsenring et al., 2011), se permitía la presencia de comorbilidad con trastornos de eje I, siempre y

cuando estuvieran estables en el momento de la inclusión en el estudio, y con otros trastornos de personalidad sólo si el TLP era el diagnóstico principal en el eje II. La recogida de datos sociodemográficos y la evaluación clínica fue llevada a cabo por psiquiatras experimentados. El grupo de pacientes estaba formado principalmente por mujeres (84%), de una edad media de 30 años ( $DT = 7,3$ ) y un perfil clínico de gravedad moderada de acuerdo a la puntuación total de la DIB-R.

En todos aquellos pacientes reclutados a partir de 2009 se evaluó la presencia de antecedentes de sucesos traumáticos en la infancia mediante un cuestionario autoaplicado, el CTQ-SF (del inglés, *Childhood Trauma Questionnaire—Short Form*) (Bernstein et al., 2003).

El grupo control estaba formado por 442 sujetos seleccionados al azar de entre los donantes de sangre del Hospital Universitari Vall d'Hebron. Dichos sujetos no fueron evaluados específicamente para descartar psicopatología o antecedentes de traumas infantiles; no obstante, debido a los criterios de exclusión para la donación de sangre ([http://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/medicinaTransfusional/publicaciones/docs/criteriosBasicosTomoll\\_2006\\_030907.pdf](http://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/medicinaTransfusional/publicaciones/docs/criteriosBasicosTomoll_2006_030907.pdf)) en principio eran sujetos sin patología psiquiátrica aguda ni seguimiento psiquiátrico regular, así como tampoco usuarios de drogas vía parenteral o enfermos orgánicos graves. Además, la propia evolución del TLP, que, tal y como se ha expuesto en la Introducción, suele ser hacia la remisión, nos hace pensar que la prevalencia de sujetos con TLP en el grupo control debería ser muy baja, puesto que en este grupo la edad media era de 53,5 años. El grupo control comprendía un 82% de mujeres, de una edad media de 53,5 años ( $DT = 18,6$ ) y de la misma región geográfica que los pacientes.

Como se detalla en cada uno de los manuscritos, los estudios que evalúan los objetivos secundarios (papel de los traumas infantiles en la gravedad del TLP y estudio de metilación) emplean únicamente sujetos con TLP, una parte de los cuales coincide con la muestra arriba descrita.

### **3.3. INSTRUMENTOS DE EVALUACIÓN**

a) *Structured Clinical Interview for Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-IV (DSM-IV) Axis II Disorders (SCID-II)*: Se trata de una entrevista semi-estructurada para evaluar la presencia de trastornos de personalidad según los criterios diagnósticos del DSM. Empleamos

la versión validada al castellano (Gómez-Beneyto et al., 1994), la cual se basa en los criterios del DSM-III-R y ha mostrado una buena capacidad de discriminación entre los trastornos de eje II. La fiabilidad entre entrevistadores depende del trastorno de personalidad, pero la concordancia global (presencia o ausencia del diagnóstico) es buena, con un coeficiente kappa de 0,85. La entrevista tiene un total de 148 ítems, cada uno de los cuales se puntúa como ausente/falso, subumbral o umbral/verdadero, o como desconocido.

b) *Revised Diagnostic Interview for Borderlines (DIB-R)*: Consiste en una entrevista semi-estructurada para evaluar la presencia de TLP en los últimos dos años. Utilizamos la versión validada al castellano (Barrachina et al., 2004), la cual ha mostrado buenas propiedades psicométricas, tanto en consistencia interna (alfa de Cronbach = 0,89), como en fiabilidad entre entrevistadores (correlación intraclase = 0,94), sensibilidad (0,81) y especificidad (0,94). La validez convergente del diagnóstico con la SCID-II es aceptable (kappa = 0,59). Esta entrevista consta de un total de 125 ítems, de los cuales 94 son preguntas directas al paciente y el resto frases resumen e ítems de puntuación. Cada ítem se puntúa como 2 (sí), 1 (probable) o 0 (no). La entrevista está dividida en 4 áreas consideradas de importancia en la clínica del TLP: área de la afectividad, área de la cognición, área del patrón de conductas impulsivas y área de las relaciones interpersonales. A partir de la puntuación de cada área se acaba obteniendo un valor total de la entrevista dentro del intervalo 0 a 10; una puntuación total de 6 o más se considera indicativa de TLP.

c) *Childhood Trauma Questionnaire – Short Form (CTQ-SF)* (Bernstein et al., 2003): Es una versión del CTQ original (Bernstein et al., 1994) desarrollado mediante análisis factorial de los 70 ítems originales, y que ha demostrado su validez como instrumento de *screening* en población clínica y no clínica. Se trata de un cuestionario autoaplicado de 28 ítems, cada uno de los cuales se puntúa siguiendo una escala tipo Likert de 5 puntos que va de “nunca” a “muy a menudo”. El cuestionario está dividido en cinco subescalas: abuso sexual, abuso físico, abuso emocional, negligencia física y negligencia emocional. Cada subescala tiene una puntuación final de entre 5 y 25 puntos, a partir de la cual se puede determinar la gravedad del abuso (nula, baja, moderada o grave) en base a unos puntos de corte definidos. Siguiendo el ejemplo de estudios previos (Heim et al., 2009), para cada subescala consideramos una historia positiva de trauma si la gravedad era al menos moderada (en concreto, puntuación de corte de 8 o más para abuso sexual, 10 o más para abuso físico, 13 o más para abuso emocional, 10 o más para negligencia física y 15 o más para negligencia emocional). En el momento de inicio del estudio

no existía aún una versión de la escala validada al castellano, con lo que empleamos una traducción de la misma. La versión inglesa original tiene unas buenas propiedades psicométricas, que incluyen especificidad, sensibilidad y validez convergente y discriminante. Los coeficientes de consistencia interna van de 0,92 a 0,95 para el abuso sexual, 0,81 a 0,86 para el abuso físico, 0,84 a 0,89 para el abuso emocional, 0,61 a 0,78 para la negligencia física y 0,85 a 0,91 para la negligencia emocional. El abuso sexual se define como “contacto o conducta sexual entre un menor de 18 años y una persona mayor o adulta”. El abuso físico como “asalto físico a un niño perpetrado por una persona mayor o adulta que suponga un riesgo o resulte en daño”. El abuso emocional como “asalto verbal al bienestar de un niño o cualquier conducta despreciativa o humillante hacia un niño realizada por una persona mayor o adulta”. La negligencia física como “fallo de los cuidadores para proveer a un niño de sus necesidades físicas básicas”. Y la negligencia emocional como “fallo de los cuidadores para proporcionar las necesidades emocionales y psicológicas básicas de un niño”.

### **3.4. GENOTIPADO**

Las muestras de sangre se recogieron sistemáticamente siguiendo las técnicas habituales. El DNA genómico se extrajo de los leucocitos periféricos empleando el procedimiento *salting out* (Autopure, Qiagen) (Miller, Dykes, & Polesky, 1989).

Entre los dos estudios de genotipado se han analizado 87 polimorfismos, 47 de 10 genes del eje HHA (*AVPR1A*, *AVPR1B*, *CRH-BP*, *CRHR1*, *CRHR2*, *FKBP5*, *GCR* – nombre alternativo *NR3C1* -, *NPY*, *NPY1R* y *NYP2R*) y 40 de 4 genes del sistema noradrenérgico (*ADRB2*, *COMT*, *DBH* y *SLC6A2*) (Tabla 4). La selección de genes candidatos se realizó en base a la literatura existente para otros trastornos psiquiátricos con clínica común al TLP, como la depresión o el TDAH. Los polimorfismos se eligieron con el programa HapMap ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)) siguiendo los parámetros  $r^2 = 0,80$  y  $MAF = 0,05$ . Un  $r^2$  del 0,80 indica que los SNPs escogidos resuelven un 80% de la variación existente en la población seleccionada. Un MAF (del inglés, *minor allele frequency*) del 0,05 significa que la frecuencia del alelo menor en población caucásica es del 5%.

El genotipado se realizó con tecnología PCR a tiempo real y *arrays* Taqman Custom (Taqman Custom open arrays), en un laboratorio externo (Servei Veterinari de Genètica Molecular [SVGM], Facultad de Veterinaria, Universitat Autònoma de Barcelona). Todos los

polimorfismos investigados superaron con éxito los controles de calidad (*calling rate* >95% para todos los SNPs e individuos) y cumplían el equilibrio de Hardy-Weinberg, a excepción de *CRHR1* rs173365, *SLC6A2* rs40147, *DBH* rs7851898 y *ADRB2* rs1801704.

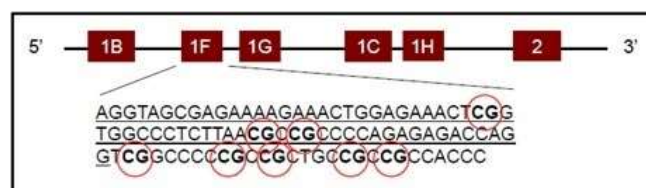
**Tabla 4. Polimorfismos analizados.**

NOMBRE DEL GEN	TagSNP (MAF = 0,05, R <sup>2</sup> = 0,8)
<i>FKBP5</i> (KF 506 binding protein 5)	rs9380526, rs10947563, rs3798347, rs4713902, rs3777747, rs3798346, rs9470079, rs17614642 ( <b>8 SNPs</b> )
<i>CRHR1</i> (corticotropin releasing hormone receptor 1)	rs17763533, rs110402, rs173365, rs242942, rs17763104, rs2664008, rs12944712 ( <b>7 SNPs</b> )
<i>CRHR2</i> (corticotropin releasing hormone receptor 2)	rs6965973, rs2284218, rs4722999, rs2190242, rs929377, rs12701020, rs2267717, rs975537, rs2284217, rs2267716 ( <b>10 SNPs</b> )
<i>CRH-BP</i> (corticotropin releasing hormone – binding protein)	rs1053989, rs10514082, rs10062367, rs32897 ( <b>4 SNPs</b> )
<i>AVPR1B</i> (arginine vasopressin receptor 1B)	rs28373064 ( <b>1 SNP</b> )
<i>AVRP1A</i> (arginine vasopressin receptor 1A)	rs10877968, rs7298346, rs1042615 ( <b>3 SNPs</b> )
<i>NR3C1</i> (glucocorticoid receptor)	rs9324918, rs852977, rs17339831, rs10041520, rs17100236, rs17287745, rs4912905, rs2963155 ( <b>8 SNPs</b> )
<i>NPY</i> (neuropeptide Y)	rs5574, rs16138 ( <b>2 SNPs</b> )
<i>NPY1R</i> (neuropeptide Y receptor Y1)	rs4552421, rs4691075, rs9764 ( <b>3 SNPs</b> )
<i>NPY2R</i> (neuropeptide Y receptor Y2)	rs1047214 ( <b>1 SNP</b> )
<i>ADRB2</i> (adrenoceptor beta 2, surface)	rs1042717, rs1801704 ( <b>2 SNPs</b> )
<i>COMT</i> (catechol-O-methyltransferase)	rs4633, rs4680, rs740601, rs165774, rs174696, rs737865, rs933271, rs4646316, rs5993882, rs9332377 ( <b>10 SNPs</b> )
<i>DBH</i> (dopamine beta-hydroxylase)	rs77905, rs129882, rs7851898, rs1541332, rs1611125, rs2007153, rs2283124, rs2519143, rs2797851, rs2797853, rs3025382, rs3025388 ( <b>12 SNPs</b> )
<i>SLC6A2</i> (solute carrier family 6, member 2 = norepinephrine transporter)	rs5568, rs5569, rs15534, rs36020, rs36021, rs36023, rs36024, rs40147, rs41154, rs47958, rs1800887, rs1814270, rs1861646, rs2242447, rs17307291, rs3785151 ( <b>16 SNPs</b> )
<b>Total SNPs</b>	<b>87 SNPs</b>

El análisis de metilación del GR se realizó en el laboratorio de genética del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. El tratamiento del ADN y la amplificación PCR fueron llevados a cabo con los kits EpiTech Bisulfite y PyroMark PCR (Qiagen) respectivamente, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La pirosecuenciación se realizó con el PyroMark Q24 (Qiagen). Se estudió el patrón de metilación de 8 islas CpG situadas en el exón 1F (Figura 4).

**Figura 4. Representación esquemática de la región reguladora 5' de NR3C1.**

Subrayado: exón 1F. Rodeado: islas CpG analizadas, ordenadas de CpG1 a CpG8.



### **3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Los análisis estadísticos realizados en cada estudio se detallan en los artículos respectivos (ver sección Resultados).

### **3.6. ASPECTOS ÉTICOS**

Todos los estudios incluidos en esta tesis fueron aprobados por los Comités Éticos de Investigación Clínica (CEIC) de los tres hospitales colaboradores. Se siguieron los principios de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial.

Los participantes firmaron los respectivos consentimientos informados y no recibieron retribución económica alguna por su participación.

---

# Resultados

---





**Estudio 1**

Martín-Blanco, A., Soler, J., Villalta, L., Feliu-Soler, A., Elices, M., Pérez, V., Arranz, M.J., Ferraz, L., Alvarez, E., & Pascual, J.C. (2014). Exploring the interaction between childhood maltreatment and temperamental traits on the severity of borderline personality disorder. *Comprehensive psychiatry*, 55, 311-318. doi: 10.1016/j.comppsy.2013.08.026.





## Exploring the interaction between childhood maltreatment and temperamental traits on the severity of borderline personality disorder

Ana Martín-Blanco, Joaquim Soler, Laia Villalta, Albert Feliu-Soler, Matilde Elices, Víctor Pérez, María Jesús Arranz, Liliana Ferraz, Enrique Álvarez, Juan Carlos Pascual\*

Department of Psychiatry, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental, CIBERSAM, Institut d'Investigació Biomèdica-Sant Pau (IIB-SANT PAU), Barcelona, Spain

### Abstract

**Background:** Childhood maltreatment and temperamental traits play a role in the development of Borderline Personality Disorder (BPD). The aim of the present study was to assess the involvement and the interrelationship of both factors in the clinical severity of BPD.

**Method:** The self-reported history of childhood trauma, psychobiological temperamental traits, and severity of BPD symptoms were evaluated in 130 subjects with BPD.

**Results:** Approximately 70% of the sample reported some form of abuse or neglect. Childhood maltreatment inversely correlated with sociability, but no correlation was observed with the other temperamental traits. The regression model showed that neuroticism–anxiety and aggression–hostility traits, as well as emotional abuse, were risk factors independently associated with the severity of BPD. Sexual abuse was not associated with the severity of the disorder. Finally, the interaction between high neuroticism–anxiety traits and the presence of severe emotional abuse was associated with BPD severity.

**Conclusion:** These results suggest that the interaction between temperamental traits and childhood emotional abuse has an influence not only on the development but also on the severity of BPD. Further studies are needed to identify more biological and environmental factors associated with the severity of the disorder.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Borderline personality disorder (BPD) is a common and serious psychiatric disorder with an estimated prevalence between 0.5% and 5.9% in the general population [1]. Although long-term follow-up studies of subjects with BPD report symptomatic remission rates of about 90%, they also show a permanent impairment in the psychosocial functioning of most of these patients [2–4]. Furthermore, these subjects are major consumers of mental health resources and their rates of suicide vary between 8% and 10% [1,2,5]. Thus, the serious clinical and social consequences of this

disorder make essential the study of the factors involved in its development and severity.

While there are several studies about the development of BPD, little attention has been paid to the study of the factors associated with its severity. The few studies on this topic highlight childhood trauma as an important factor, which has been related to, not only the severity of BPD symptoms, but also some indicators of seriousness, like psychosocial impairment [6,7] and suicidal attempts [8,9]. This is a relevant point, since childhood trauma is very common in subjects with BPD. Between 30% and 90% of these subjects report having suffered some kind of traumatic event in childhood [10–13]. Specifically, retrospective studies about childhood abuse in BPD describe rates of sexual abuse between 40% and 71% [10,12], physical abuse between 25% and 73% [10,14], and emotional abuse between 13% and 76% [12,15]. In fact, childhood trauma is considered the main environmental factor involved in BPD development. This assumption is supported by prospective studies [16–19]. For instance, Widom et al. (2009) followed 500 children who had

Declaration of interest: none. Funding sources are detailed in the Acknowledgments.

\* Corresponding author. Department of Psychiatry, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental, CIBERSAM, Av. Sant Antoni M<sup>a</sup> Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 553 78 40; fax: +34 93 553 78 42.

E-mail address: [jpascual@santpau.cat](mailto:jpascual@santpau.cat) (J.C. Pascual).

suffered physical and sexual abuse and neglect and 396 matched controls, and observed that significantly more abused/neglected children met criteria for BPD in adulthood in comparison to controls [19].

Childhood trauma, however, does not always lead to psychopathology. Some reviews have reported that around 30% of victims of sexual abuse will not exhibit psychiatric problems as adults [20]. There are even more optimistic data. Spataro et al. (2004) showed that only 12.4% of subjects who had suffered childhood sexual abuse looked for future psychiatric treatment [18] and Collishaw et al. (2007) described that 44.5% of abused children do not report psychopathology over a period of 30 years [21]. In the aforementioned study by Widom et al. (2009) only 14.9% of abused/neglected children met criteria for BPD as adults, and the relationship between childhood trauma and BPD was mediated by other factors, such as having a parent with a substance use disorder, the educational level or meeting criteria for substance abuse, major depressive disorder or posttraumatic stress disorder [19]. Another mediating factor which has received much attention in BPD is temperament. In fact, according to the biopsychosocial model of BPD, this disorder results from the interaction between biologically-based temperamental vulnerabilities and adverse experiences in childhood [22–25]. Several studies support this model. For example, Gratz et al. (2011) studied the relationship between two personality traits (affective dysfunction and impulsivity), emotional abuse and borderline personality features in a sample of children, and showed that both vulnerability personality traits and emotional abuse were associated with borderline features and that the relationship between emotional abuse and borderline features in children seemed to be moderated by affective dysfunction [26]. Laporte et al. (2011) assessed personality traits and childhood trauma in a sample of women with BPD and their sisters, and concluded that sensitivity to adverse events might be influenced by personality trait profiles [15].

Whether this interaction between childhood adverse events and temperamental traits influences the severity of this disorder, as happens in its development, is still unknown. In fact, the knowledge about the influence of temperament on BPD severity is scarce. This disorder has been suggested to be a maladaptive version of normative personality characteristics [27,28], an assumption supported by genetic studies [29,30]. According to the most studied normative personality model in BPD, the Five-Factor Model of Personality (FFM) assessed by the NEO Personality Inventory (NEO-PI) [31], BPD is characterized by high neuroticism and low agreeableness and conscientiousness [28]. This disorder has also been related to another model of normative personality, the Zuckerman's Alternative Five Factor Model (AFFM) [32], according to which subjects with BPD are characterized by high scores in neuroticism–anxiety and impulsivity–sensation seeking, and low scores in activity [33]. To date, few studies about the influence of normative personality traits on BPD severity have been

published. For example, Laporte et al. (2011) showed that temperamental traits of neuroticism, problems in intimacy and impulsivity were predictors of BPD severity [15], and Bornovalova et al. (2011) reported a moderating effect of distress tolerance on the relationship between two temperamental-based emotional processes (negative emotionality and negative affect intensity) and levels of BPD [34].

Since both childhood trauma and temperament seem to somehow individually influence BPD severity, we hypothesized that, as it happens in the development of the disorder, the interaction between both factors might be associated with its severity. In order to investigate this, we assessed the involvement of temperamental traits and childhood trauma, as well as their interrelationship, in the severity of BPD.

## 2. Methods

### 2.1. Participants and procedure

A total of 130 patients with a diagnosis of BPD were recruited from outpatient facilities of the BPD Unit of the Department of Psychiatry, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. An experienced psychiatrist carried out a clinical interview to collect sociodemographic and clinical variables such as age, sex, previous hospitalizations, history of self-injury, substance use, psychotropic medication as well as lifetime comorbidities with Axis I disorders. Furthermore, an experienced clinical psychologist led a psychiatric evaluation including Spanish validated versions of two semi-structured diagnostic interviews, the *Structured Clinical Interview for Diagnostic and statistical manual of mental disorders-IV (DSM-IV) Axis II Disorders (SCID-II)* [35] and the *Revised Diagnostic Interview for Borderlines (DIB-R)* [36]. Only data from patients who met diagnostic criteria for BPD according to both interviews were analysed (the inter-rater kappa between the two instruments was 0.7). Before enrolling any therapeutic program, these patients filled in three self-administered scales to evaluate the history of childhood trauma, the temperamental traits, and the severity of BPD symptoms. Inclusion criteria consisted of: (a) diagnosis of BPD according to DSM-IV criteria; (b) being between 18 and 45 years old; (c) no current episode of any Axis I disorders according to DSM-IV criteria, including substance dependence; and (d) no severe physical conditions, such as organic brain syndrome, neurological disease or mental deficiency.

In order to be able to generalize the results by improving the external validity, comorbidity with other Axis II diagnosis, psychotropic medication therapy and previous comorbid axis I diagnosis including history of substance misuse, were permitted in the sample. The study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and the principles outlined in the Declaration of Helsinki were followed. The participants did not receive any retribution and an informed consent form to participate in the study was acquired.

## 2.2. Assessment instruments

### 2.2.1. Diagnostic instruments

- *Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis II Personality Disorders (SCID-II)* [35]: We used the validated Spanish version of the SCID-II, a semi-structured interview to assess personality disorders according to DSM-IV criteria. This Spanish version is based on the DSM-III-R version of the SCID-II, and has shown a fine discrimination among the Axis II personality disorders. The reliability between interviewers ranges from kappa = 0.37 to kappa = 1, depending on the personality disorder, and the overall kappa is 0.85 [35].
- *Revised Diagnostic Interview for Borderlines (DIB-R)* [36]: We used the validated version for Spanish-speaking samples of the DIB-R, a semi-structured interview that provides the diagnosis of BPD within the last two years. This instrument has shown good psychometric properties in terms of total internal consistency (Cronbach's alpha: 0.89), inter-rater reliability (within-class correlation: 0.94), sensitivity (0.81), specificity (0.94) and a moderate convergent validity of the diagnosis with the SCID-II (kappa: 0.59) [36].

### 2.2.2. Clinical measures

- *Childhood Trauma Questionnaire-Short Form (CTQ-SF)* [37]: It is a version from the original CTQ which provides reliable and valid retrospective assessment of child abuse and neglect [38]. CTQ-SF is a 28-item self-report scale developed by means of exploratory and confirmatory factor analyses of the 70 original CTQ items. Its validity in clinical and non referred population as a screening tool for maltreatment histories in childhood has been tested. Items on the CTQ-SF are rated on a 5-point, Likert-type scale ranging from Never True to Very Often True. This questionnaire is divided into five clinical subscales, inquiring about five types of maltreatment: sexual, physical, and emotional abuse, as well as physical and emotional neglect. Sexual abuse is defined as “sexual contact or conduct between a child younger than 18 years of age and an adult or older person”. Physical abuse as “bodily assaults on a child by an adult or older person that posed a risk of or resulted in injury”. Emotional abuse as “verbal assaults on a child's sense of worth or well-being or any humiliating or demeaning behavior directed toward a child by an adult or older person”. Physical neglect as “the failure of caretakers to provide for a child's basic physical needs, including food, shelter, clothing, safety, and health care”. And emotional neglect as “the failure of caretakers to meet children's basic emotional and psychological needs, including love, belonging, nurturance, and support” [37]. We used the accepted cut-

off for each subscale to select those patients with moderate to severe maltreatment [39]. A good internal consistency of the CTQ-SF for each subscale across 4 heterogeneous samples has been reported: sexual abuse = 0.92 to 0.95, physical abuse = 0.81 to 0.86, emotional abuse = 0.84 to 0.89, physical neglect = 0.61 to 0.78, and emotional neglect = 0.85 to 0.91 [37].

- *Zuckerman-Kuhlman Personality Questionnaire (ZKPQ)* [40]: It is a self-administered scale which identifies the basic personality dimensions from a psychobiological perspective. It includes the fundamental dimensions of temperament used in psychobiological research, and it is based on the AFFM, which was created from a series of factor analyses of scales that measured the basic personality dimensions [41]. Traits of the AFFM measured by the scale are as follows: neuroticism–anxiety (N-Anx), impulsive–sensation seeking (ImpSS), aggression–hostility (Agg-Host), activity (Act), and sociability (Sy). There are a total of 99 dichotomous items, in sentence format and true–false response set. The ZKPQ includes an Infrequency scale (Infreq, 10 items) detecting inattention to the task. We used the validated Spanish version of the ZKPQ, which has shown good psychometric properties, with test–retest reliability coefficients ranging from 0.77 to 0.91, internal consistency with coefficients ranging from 0.67 to 0.84, and convergent, discriminant, and consensual validity [42].
- *Borderline Symptom List-23 (BSL-23)* [43]: It is a 23 item self-rating instrument used to assess the typical symptomatology and severity of BPD. It has emerged from BSL-95, which includes 95 items and is based on DSM-IV criteria, DIB-R and opinion of clinical experts and patients with BPD. Their authors selected, from the 95 original items, 23 items with high sensitivity to change and high ability to discriminate BPD from other pathologies. Both versions have shown good psychometric properties with high internal consistency, capacity to discriminate BPD from other Axis I diagnosis, and sensitivity to the effects of therapy. We used a validated Spanish version with good psychometric properties in terms of total internal consistency (Cronbach's alpha: 0.936), one-week temporal reliability ( $r = 0.73$ ), correlation with DIB-R scores and discrimination among different levels of BPD severity [44].

## 2.3. Statistical analysis

All analyses were performed with the SPSS 18.0 software package for Windows and all hypotheses were tested with a two-sided significance level of 0.05.

Associations between demographic variables (including age, gender and years of education) and BPD severity by

means of Pearson correlation and t-test were performed so as to identify potential covariates to be included in the regression model. Pearson correlation analyses between ZKPQ subscales scores and CTQ-SF subscales scores were carried out to assess the associations between temperament and childhood trauma. To evaluate the effect of temperamental traits and childhood maltreatment types on BPD severity, new correlation analyses were performed between BSL-23 scores and ZKPQ and CTQ-SF subscales scores. In addition, a linear regression model was carried out, including as independent variables those significant subscales of ZKPQ and CTQ-SF to confirm their effect on BPD severity (BSL-23 score as dependent variable).

Associations of BPD severity with the interaction between the significant temperamental traits and childhood trauma was studied using Generalized Linear Model (GZLM) analyses in order to estimate the effect of the interaction between those significant subscales of CTQ-SF and ZKPQ on BSL-23 scores.

### 3. Results

#### 3.1. Patient demographics and clinical characteristics

Demographic and clinical characteristics of the subjects are summarized in Table 1. The majority of individuals were women (85%) and the mean age was 30.4 years old (SD = 6.9; range: 18–45). All subjects were Caucasian except one African individual, eight subjects were immigrants. Nearly a third of the sample (37%) were married or cohabiting, and only 32% of subjects had a full-time employment. The

Table 1  
Demographic and descriptive data.

	Mean (SD)
<i>Demographic characteristics</i>	
Gender [n (% females)]	111 (85.5)
Age	30.4 (6.9)
Years of education	13.7 (4.2)
Marital status (married or cohabiting) [n (%)]	48 (36.9)
Full-time employment [n(%)]	42 (32.3)
<i>Severity variables</i>	
DIB-R total score	7.7 (1.3)
BSL-23 score	43.7 (22)
Previous hospitalizations [n (%)]	71 (55.5)
History of self-injury [n (%)]	99 (77.3)
<i>Zuckerman–Kuhlman Personality Questionnaire scales</i>	
Neuroticism–anxiety (N-Anx)	16.1 (3.5)
Impulsive–Sensation Seeking (ImpSS)	11.4 (4.5)
Aggression–Hostility (Agg-Host)	10.8 (3.1)
Activity (Act)	7.3 (3.8)
Sociability (Sy)	5.9 (3.9)
<i>Childhood Trauma Questionnaire-Short Form</i>	
Severe Emotional Abuse [n (%)]	81 (62.3)
Severe Sexual Abuse [n (%)]	50 (38.5)
Severe Physical Abuse [n (%)]	35 (26.9)
Severe Emotional Neglect [n (%)]	59 (45.4)
Severe Physical Neglect [n (%)]	30 (23.1)
Any Childhood Maltreatment [n (%)]	93 (71.5)

sample had a moderate to severe clinical profile according to BSL-23 and DIB-R scores. More than a half of the sample had been previously hospitalized and three quarters had a history of self-injury. Past comorbidity with mood, anxiety and eating Axis I disorders, as well as Axis-II co-occurrent personality disorders, was frequent. Around half of the sample reported history of substance misuse. On ZKPQ, subjects with BPD scored high on N-Anx, ImpSS and Agg-Host subscales and low on Act and Sy subscales. According to CTQ-SF, 62% of the sample had suffered severe emotional abuse and about 40% severe sexual abuse. More than 70% of the subjects reported some kind of childhood abuse or neglect.

#### 3.2. Personality traits and childhood maltreatment factors associated with BPD severity

No correlations between N-Anx, ImpSS, Agg-Host or Act subscales and any CTQ-SF subscales were observed. Only Sy dimension of ZKPQ was significantly inversely related to the following scales of CTQ-SF: emotional abuse ( $r = -0.22$ ,  $p = 0.01$ ), physical abuse ( $r = -0.23$ ,  $p = 0.01$ ), and emotional neglect ( $r = -0.23$ ,  $p = 0.01$ ) (Table 2).

BSL-23 scores were not significantly associated with any of the demographic variables ( $p > .01$ ), so they were not finally included as covariates in subsequent analyses. Higher scores on N-Anx and Agg-Host subscales of ZKPQ and on emotional abuse subscale of CTQ-SF were more likely to have higher scores on BSL-23. Table 3 shows the final results of the subsequent linear regression model taking BSL-23 scores as dependent variable. The regression model displayed a significant model ( $F = 10.90$ ,  $p < 0.001$ ) which included N-Anx and Agg-Host subscales of ZKPQ and emotional abuse subscale from CTQ-SF. The model explained almost 30% of the variance ( $R^2 = 0.29$ ).

#### 3.3. Interactive effect of emotional abuse and personality traits on BPD severity

The first GZLM analysis was performed considering BSL-23 scores as dependent variable and N-Anx and emotional abuse scores as covariates. The model was statistically significant (omnibus test: likelihood ratio [LR] chi square = 160.2,  $df = 3$ ,  $P < 0.001$ ). Among the independent covariates, N-Anx showed a significant effect (LR chi square = 33.6,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ ) while emotional abuse did not (LR chi square = 0.3,  $df = 1$ ,  $P = 0.56$ ). The interaction between the two covariates showed a tendency towards significance (N-Anx\*emotional abuse: LR chi square = 2.6,  $df = 1$ ,  $P = 0.1$ ). To illustrate such interaction, N-Anx and emotional abuse were dichotomized. N-Anx was dichotomized as high or low using median value, and emotional abuse as severe or not severe according to accepted cut-off points of CTQ-SF subscales [39]. A two-way ANOVA analysis was then performed, including high or low N-Anx trait and presence or absence of severe emotional abuse. A significant main effect was found

Table 2  
Pearson correlation analyses between ZKPQ, CTQ-SF, and BSL-23 scores.

	CTQ-SF emotional abuse	CTQ-SF sexual abuse	CTQ-SF physical abuse	CTQ-SF emotional neglect	CTQ-SF physical neglect	BSL-23
ZKPQ N-Anx	.17	.02	.05	.05	-.04	.47**
ZKPQ ImpSS	-.07	.00	-.10	-.00	.04	.13
ZKPQ Agg-Host	.06	-.01	-.01	-.07	.02	.31**
ZKPQ Act	-.004	-.08	.02	.02	.02	-.13
ZKPQ Sy	-.22**	-.14	-.23**	-.23**	-.04	-.11
BSL-23	.19*	.08	.07	.12	.12	

N-Anx: neuroticism–anxiety; ImpSS: impulsive–sensation seeking; Agg-Host: aggression–hostility; Act: activity; Sy: sociability.

\*  $p < .1$ .

\*\*  $p \leq .01$ .

[ $F(3,78) = 5.8, P = 0.001$ ]. There was a significant effect of N-Anx scores on BSL-23 scores [ $F(1,78) = 5.2, P = 0.024$ ], but there was no effect of severe emotional abuse. The interaction between these two factors remained significant [ $F(1,78) = 5.7, P = 0.019$ ]. Fig. 1 shows this effect, where the interaction between high N-Anx scores and severe emotional abuse associates with clinical severity.

The second GZLM model with Agg-Host and emotional abuse as covariates, was also statistically significant (omnibus test: likelihood ratio [LR] chi square = 147.2,  $df = 3, P < 0.001$ ). Agg-Host covariate was significant (LR chi square = 27.4,  $df = 1, P < 0.001$ ) whereas emotional abuse was not (LR chi square = 2.2,  $df = 1, P = 0.13$ ). Finally, the interaction Agg-Host\*emotional abuse did not show a significant effect (LR chi square = 0.003,  $df = 1, P = 0.9$ ).

#### 4. Discussion

The aim of this study was to assess the involvement of temperamental traits and childhood trauma, as well as their interrelationship, in the severity of BPD. We hypothesized that, as it happens in the development of the disorder, the interaction between both factors might be associated with its severity. The results confirm our hypothesis, as they show that the interaction between N-Anx temperamental trait and history of childhood emotional abuse associates with the severity of BPD.

Table 3

Linear regression analysis with neuroticism–anxiety (N-Anx), aggression–hostility (Agg-Host) and emotional abuse as independent variables for BPD severity (BSL-23 score).

	R <sup>2</sup>	p	B	p
Model	.29	<.001		
<i>Independent variables</i>				
Neuroticism–Anxiety of ZKPQ			.41	<.001
Aggression–Hostility of ZKPQ			.19	.05
Emotional Abuse of CTQ			.19	.043

R<sup>2</sup>: variance explained by the model; B: standardized Beta.

Childhood experiences of emotional and sexual abuse were very prevalent in our Spanish sample. Approximately 70% of these subjects reported some form of abuse or neglect during childhood, a rate consistent with previous studies worldwide [10,45,46]. Regarding temperamental traits, our sample was characterized by high scores on N-Anx, ImpSS and Agg-Host, and low scores on Act and Sy. This pattern agrees with other studies, using not only the AFFM [33], but also the FFM [28]. The coincidence with previous studies backs the idea that this disorder may be a maladaptive version of these normative temperamental traits [27,28]. When evaluating the association between each temperamental trait and each kind of childhood trauma, we only found sociability to inversely correlate with specific types of childhood maltreatment (emotional abuse and neglect, and physical abuse) but no correlation with the other temperamental traits was observed.

The first main finding of this study was that N-Anx and Agg-Host personality traits, as well as emotional abuse, were risk factors independently associated with the severity of BPD symptomatology, and these 3 factors accounted for 30% of the variance. Although it suggests that there are probably other non-studied factors involved in the severity, its multifactorial causality makes the 30% to be an appreciable proportion of the variance. Neuroticism has been previously related to the severity of BPD [15]. The association of N-Anx and Agg-Host with the clinical severity of BPD seems consistent, as both traits are related to characteristic and disabling symptoms of this disorder. N-Anx trait refers to “emotional upset, worry, fearfulness, indecision, lack of self confidence, and sensitivity to criticism” [40], so it might be associated with BPD’s emotional dysregulation. Agg-Host trait refers to “verbal aggression, rude, thoughtless or antisocial behavior, vengefulness, spitefulness, a quick temper and impatience with others” [40], so it could be related to impulsive aggression and BPD typical self-harm. However, the lack of association of ImpSS was an unexpected finding, since subjects with BPD scored high in this trait and impulsivity is thought to be an aggravating factor for this disorder. It could be explained by the influence of sensation seeking, which is not a characteristic trait of BPD and so may not be involved in its

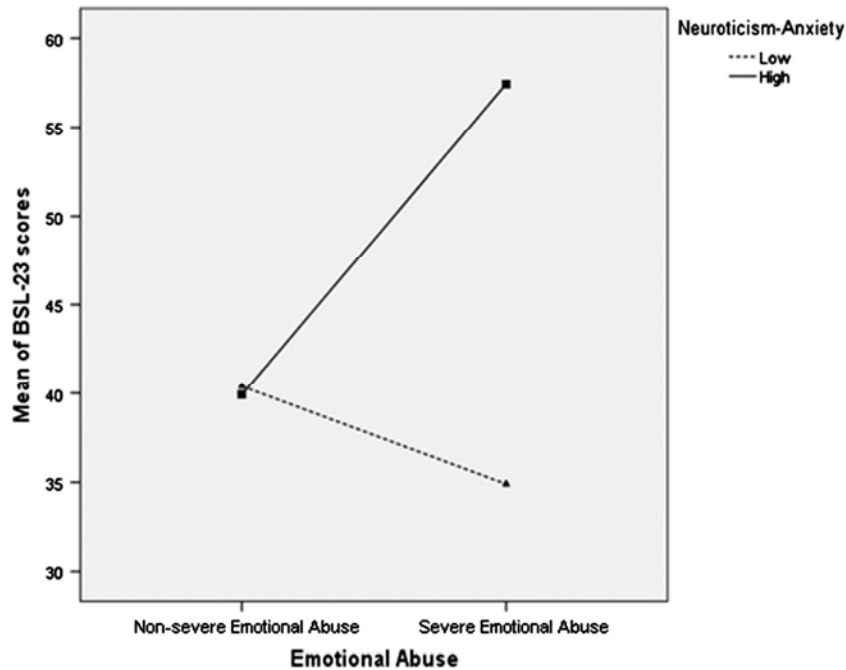


Fig. 1. Two-way ANOVA to investigate the association of BPD severity with the interaction between ZKPQ's neuroticism–anxiety (N-Anx) scores and the presence of severe emotional abuse.

severity. With regard to traumatic factors, only emotional abuse, and not the other types of childhood maltreatment, was associated with the severity of BPD. These results are consistent with some authors who begin to consider emotional abuse as the main sort of maltreatment in BPD [12,47,48]. The absence of effect of sexual abuse in contrast with previous research [8,9,49] could be explained by the lower proportion of sexually abused subjects in comparison with emotionally abused subjects in our sample.

Our second main finding was that the interaction between high neuroticism trait and severe emotional abuse was associated with high BPD clinical severity. Therefore, it suggests that severe emotional abuse may affect BPD severity mainly in highly neurotic subjects. We also found that N-Anx had a significant association with BPD severity independently of the history of emotional abuse. These findings suggest that N-Anx might be an important factor related to the clinical severity of this disorder, both directly and by means of its interaction with emotional abuse. This is in line with several studies that have shown that people high in neuroticism respond with negative emotions more frequently and intensely when they experience stressful life events [50]. Moreover, neuroticism has been related to severity in several emotional disorders, like depression [51], premenstrual dysphoric disorder [52] or alcohol dependence severity [53].

Several limitations to this study must be taken into account. Probably the main limitation is the cross-sectional design and its inability to show causality effect. Second, childhood maltreatment information was assessed self-reported and retrospectively, although the CTQ-SF is a scale of extensive use in psychiatric research. Third, BSL-23

measures clinical BPD severity at one particular moment and this score can change over time or after a therapeutic intervention. In order to minimize this limitation we assessed this variable when subjects were admitted in our unit, before starting any treatment. Fourth, no control group with healthy subjects or with other disorders was used to compare ZKPQ or CTQ-SF scores. Finally, there are probably other significant factors involved on BPD severity that have not been studied.

In conclusion, our results suggest that both temperamental traits and childhood emotional abuse are involved in the severity of BPD, and that N-Anx trait seems to moderate the association between severe emotional abuse and the severity of this disorder. Therefore, these results may have clinical implications provided that these variables might yield to the design of specific psychotherapeutic treatments focused on the management of emotional abuse and/or N-Anx and Agg-Host temperamental traits together with the usual treatments (which are mainly focused on symptoms). Further studies should test this hypothesis so as to confirm the present findings and to identify other biological and environmental risk factors associated with disorder severity. A better understanding of the mechanisms involved in the severity of BPD would allow the implementation of treatment and prevention strategies and the consequent reduction of the clinical and social impact of this disorder.

#### Acknowledgment

This study was supported by Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM) and by a



grant from Instituto de Salud Carlos III (PI10/00253 and PI11/00725).

## References

- [1] Leichsenring F, Leibing E, Kruse J, New AS, Leweke F. Borderline personality disorder. *Lancet* 2011;377:74-84.
- [2] Paris J, Zweig-Frank H. A 27-year follow-up of patients with borderline personality disorder. *Compr Psychiatry* 2001;42:482-7.
- [3] Gunderson JG, Stout RL, McGlashan TH, Shea MT, Morey LC, Grilo CM, et al. Ten-year course of borderline personality disorder: psychopathology and function from the Collaborative Longitudinal Personality Disorders study. *Arch Gen Psychiatry* 2011;68:827-37.
- [4] Zanarini MC, Frankenburg FR, Reich DB, Fitzmaurice G. Attainment and stability of sustained symptomatic remission and recovery among patients with borderline personality disorder and axis II comparison subjects: a 16-year prospective follow-up study. *Am J Psychiatry* 2012;169:476-83.
- [5] Oldham JM. Borderline personality disorder and suicidality. *Am J Psychiatry* 2006;163:20-6.
- [6] Silk KR, Lee S, Hill EM, Lohr NE. Borderline personality disorder symptoms and severity of sexual abuse. *Am J Psychiatry* 1995;152:1059-64.
- [7] Zanarini MC, Yong L, Frankenburg FR, Hennen J, Reich DB, Marino MF, et al. Severity of reported childhood sexual abuse and its relationship to severity of borderline psychopathology and psychosocial impairment among borderline inpatients. *J Nerv Ment Dis* 2002;190:381-7.
- [8] Soloff PH, Lynch KG, Kelly TM. Childhood abuse as a risk factor for suicidal behavior in borderline personality disorder. *J Pers Disord* 2002;16:201-14.
- [9] Horesh N, Nachshoni T, Wolmer L, Toren P. A comparison of life events in suicidal and nonsuicidal adolescents and young adults with major depression and borderline personality disorder. *Compr Psychiatry* 2009;50:496-502.
- [10] Zanarini MC. Childhood experiences associated with the development of borderline personality disorder. *Psychiatr Clin North Am* 2000;23:89-101.
- [11] Battle CL, Shea MT, Johnson DM, Yen S, Zlotnick C, Zanarini MC, et al. Childhood maltreatment associated with adult personality disorders: findings from the Collaborative Longitudinal Personality Disorders Study. *J Pers Disord* 2004;18:193-211.
- [12] Lobbestael J, Arntz A, Bernstein DP. Disentangling the relationship between different types of childhood maltreatment and personality disorders. *J Pers Disord* 2010;24:285-95.
- [13] Bornoalova MA, Huibregtse BM, Hicks BM, Keyes M, McGue M, Iacono W. Tests of a direct effect of childhood abuse on adult Borderline Personality Disorder traits: a longitudinal discordant twin design. *J Abnorm Psychol* 2013;122:180-94.
- [14] Golier JA, Yehuda R, Bierer LM, New AS, Schmeidler J, Silverman JM, et al. The relationship of borderline personality disorder to posttraumatic stress disorder and traumatic events. *Am J Psychiatry* 2003;160:2018-24.
- [15] Laporte L, Paris J, Guttman H, Russell J. Psychopathology, childhood trauma, and personality traits in patients with borderline personality disorder and their sisters. *J Pers Disord* 2011;25:448-62.
- [16] Johnson JG, Cohen P, Brown J, Smailes EM, Bernstein DP. Childhood maltreatment increases risk for personality disorders during early adulthood. *Arch Gen Psychiatry* 1999;56:600-6.
- [17] Johnson JG, Cohen P, Smailes EM, Skodol AE, Brown J, Oldham JM. Childhood verbal abuse and risk for personality disorders during adolescence and early adulthood. *Compr Psychiatry* 2001;42:16-23.
- [18] Spataro J, Mullen PE, Burgess PM, Wells DL, Moss SA. Impact of child sexual abuse on mental health: prospective study in males and females. *Br J Psychiatry* 2004;184:416-21.
- [19] Widom CS, Czaja SJ, Paris J. A prospective investigation of borderline personality disorder in abused and neglected children followed up into adulthood. *J Pers Disord* 2009;23:433-46.
- [20] Fergusson DM, Mullen PE. *Childhood sexual abuse: an evidence based perspective*. Thousand Oaks, CA: Sage Publications; 1999.
- [21] Collishaw S, Pickles A, Messer J, Rutter M, Shearer C, Maughan B. Resilience to adult psychopathology following childhood maltreatment: evidence from a community sample. *Child Abuse Negl* 2007;31:211-29.
- [22] Linehan MM. *Cognitive-behavioral treatment for borderline personality disorder*. New York: The Guilford Press; 1993.
- [23] Zanarini MC, Frankenburg FR. Pathways to the development of borderline personality disorder. *J Pers Disord* 1997;11:93-104.
- [24] Beauchaine TP, Klein DN, Crowell SE, Derbidge C, Gatzke-Kopp L. Multifinality in the development of personality disorders: a biology × sex × environment interaction model of antisocial and borderline traits. *Dev Psychopathol* 2009;21:735-70.
- [25] Crowell SE, Beauchaine TP, Linehan MM. A biosocial developmental model of borderline personality: elaborating and extending Linehan's theory. *Psychol Bull* 2009;135:495-510.
- [26] Gratz KL, Litzman RD, Tull MT, Reynolds EK, Lejuez CW. Exploring the association between emotional abuse and childhood borderline personality features: the moderating role of personality traits. *Behav Ther* 2011;42:493-508.
- [27] Trull TJ, Widiger TA, Lynam DR, Costa Jr PT. Borderline personality disorder from the perspective of general personality functioning. *J Abnorm Psychol* 2003;112:193-202.
- [28] Samuel DB, Widiger TA. A meta-analytic review of the relationships between the five-factor model and DSM-IV-TR personality disorders: a facet level analysis. *Clin Psychol Rev* 2008;28:1326-42.
- [29] Distel MA, Trull TJ, Willemsen G, Vink JM, Derom CA, Lynskey M, et al. The five-factor model of personality and borderline personality disorder: a genetic analysis of comorbidity. *Biol Psychiatry* 2009;66:1131-8.
- [30] Kendler KS, Myers J, Reichborn-Kjennerud T. Borderline personality disorder traits and their relationship with dimensions of normative personality: a web-based cohort and twin study. *Acta Psychiatr Scand* 2011;123:349-59.
- [31] Costa Jr PT, McCrae RR. *The NEO personality inventory manual*. Psychological Assessment Resources: Odessa, FL; 1985.
- [32] Zuckerman M. *Psychobiology of personality*. New York: Cambridge University Press; 1991.
- [33] Gomà-i-Freixanet M, Soler J, Valero S, Pascual JC, Sola VP. Discriminant validity of the ZKPQ in a sample meeting BPD diagnosis vs. normal-range controls. *J Pers Disord* 2008;22:178-90.
- [34] Bornoalova MA, Matusiewicz A, Rojas E. Distress tolerance moderates the relationship between negative affect intensity with borderline personality disorder levels. *Compr Psychiatry* 2011;52:744-53.
- [35] Gómez-Beneyto M, Villar M, Renovell M, Pérez F, Hernández M, Leal C, et al. The diagnosis of personality disorder with a modified version of the SCID-II in a Spanish clinical sample. *J Pers Disord* 1994;8:104-10.
- [36] Barrachina J, Soler J, Campins MJ, Tejero A, Pascual JC, Alvarez E, et al. Validation of a Spanish version of the diagnostic interview for borderlines revised (DIB-R). *Actas Esp Psiquiatr* 2004;32:293-8.
- [37] Bernstein DP, Stein JA, Newcomb MD, Walker E, Pogge D, Ahluvalia T, et al. Development and validation of a brief screening version of the Childhood Trauma Questionnaire. *Child Abuse Negl* 2003;27:169-90.
- [38] Bernstein DP, Fink L, Handelsman L, Foote J, Lovejoy M, Wenzel K, et al. Initial reliability and validity of a new retrospective measure of child abuse and neglect. *Am J Psychiatry* 1994;151:1132-6.
- [39] Bernstein DP, Fink L. *Childhood Trauma Questionnaire. A retrospective self-report*. San Antonio, USA: The Psychological Corporation; 1998.
- [40] Zuckerman M. Zuckerman-Kuhlman personality questionnaire (ZKPQ): an alternative five-factorial model. In: De Raad B, &

- Perugini M, editors. Big five assessment Seattle WA: Hogrefe and Huber Publishers; 2002. p. 377-96.
- [41] Zuckerman M, Kuhlman DM, Camac C. What lies beyond E and N? Factor analyses of scales believed to measure basic dimensions of personality. *J Pers Soc Psychol* 1998;54:96-107.
- [42] Gomà-i-Freixanet M, Valero S, Puntí J, Zuckerman M. Psychometric properties of the Zuckerman–Kuhlman Personality Questionnaire in a Spanish sample. *Eur J Psychol Assess* 2004;84:279-86.
- [43] Bohus M, Kleindienst N, Limberger MF, Stieglitz RD, Domsalla M, Chapman AL, et al. The short version of the Borderline Symptom List (BSL-23): development and initial data on psychometric properties. *Psychopathology* 2009;42:32-9.
- [44] Soler J, Vega D, Feliu-Soler A, Trujols J, Soto A, Elices M, et al. Validation of the Spanish version of the Borderline Symptom List, short form (BSL-23). *BMC Psychiatry* May 14 2013;13:139, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-244X-13-139>.
- [45] Bandelow B, Krause J, Wedekind D, Broocks A, Hajak G, Rüther E. Early traumatic life events, parental attitudes, family history, and birth risk factors in patients with borderline personality disorder and healthy controls. *Psychiatry Res* 2005;134:169-79.
- [46] Huang J, Yang Y, Wu J, Napolitano LA, Xi Y, Cui Y. Childhood abuse in Chinese patients with borderline personality disorder. *J Pers Disord* 2012;26:238-54.
- [47] Bornoalova MA, Gratz KL, Delany-Brumsey A, Paulson A, Lejuez CW. Temperamental and environmental risk factors for borderline personality disorder among inner-city substance users in residential treatment. *J Pers Disord* 2006;20:218-31.
- [48] Hernandez A, Arntz A, Gaviria AM, Labad A, Gutiérrez-Zotes JA. Relationships between childhood maltreatment, parenting style, and borderline personality disorder criteria. *J Pers Disord* 2012;26:727-36.
- [49] Lieb K, Zanarini MC, Schmahl C, Linehan MM, Bohus M. Borderline personality disorder. *Lancet* 2004;364:453-61.
- [50] Lahey BB. Public health significance of neuroticism. *Am Psychol* 2009;64:241-56.
- [51] Brown TA. Temporal course and structural relationships among dimensions of temperament and DSM-IV anxiety and mood disorder constructs. *J Abnorm Psychol* 2007;116:313-28.
- [52] Gingnell M, Comasco E, Orelund L, Fredrikson M, Sundström-Poromaa I. Neuroticism-related personality traits are related to symptom severity in patients with premenstrual dysphoric disorder and to the serotonin transporter gene-linked polymorphism 5-HTTLPR. *Arch Womens Ment Health* 2010;13:417-23.
- [53] Schwandt ML, Heilig M, Hommer DW, George DT, Ramchandani VA. Childhood trauma exposure and alcohol dependence severity in adulthood: mediation by emotional abuse severity and neuroticism. *Alcohol Clin Exp* 2013;37:984-92.

**Estudio 2**

Martín-Blanco, A., Ferrer, M., Soler, J., Arranz, M.J., Vega, D., Calvo, N., Elices, M., Sanchez-Mora, C., García-Martinez, I., Salazar, J., Carmona, C., Bauzà, J., Prat, M., Pérez, V., & Pascual, J.C. (2015). The role of hypothalamus-pituitary-adrenal genes and childhood trauma in borderline personality disorder. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*. doi: 10.1007/s00406-015-0612-2.



# The role of hypothalamus–pituitary–adrenal genes and childhood trauma in borderline personality disorder

Ana Martín-Blanco<sup>1,2</sup> · Marc Ferrer<sup>2,3</sup> · Joaquim Soler<sup>1,2</sup> · Maria Jesús Arranz<sup>1,4</sup> · Daniel Vega<sup>2,5,6</sup> · Natalia Calvo<sup>2,3</sup> · Matilde Elices<sup>1,2</sup> · Cristina Sanchez-Mora<sup>7</sup> · Iris García-Martínez<sup>7</sup> · Juliana Salazar<sup>8</sup> · Cristina Carmona<sup>1,2</sup> · Joana Bauzá<sup>1,2</sup> · Mónica Prat<sup>2,3</sup> · Víctor Pérez<sup>1,2</sup> · Juan C. Pascual<sup>1,2</sup>

Received: 6 February 2015 / Accepted: 29 June 2015  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

**Abstract** Current knowledge suggests that borderline personality disorder (BPD) results from the interaction between genetic and environmental factors. Research has mainly focused on monoaminergic genetic variants and their modulation by traumatic events, especially those occurring during childhood. However, to the best of our knowledge, there are no studies on the genetics of hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA) axis, despite its vulnerability to early stress and its involvement in BPD pathogenesis. The aim of this study was to investigate the contribution of genetic variants in the HPA axis and to explore the modulating effect of childhood trauma in a large sample of BPD patients and controls. DNA was obtained from a sample of 481 subjects with BPD and 442 controls. Case–control differences in allelic frequencies of 47 polymorphisms in 10 HPA axis genes were analysed. Modulation of genetic associations by the presence of childhood trauma was also investigated by dividing the sample into three groups: BPD with trauma, BPD without trauma and controls. Two *FKBP5* polymorphisms (rs4713902-C and rs9470079-A) showed significant associations with BPD. There were

also associations between BPD and haplotype combinations of the genes *FKBP5* and *CRHR1*. Two *FKBP5* alleles (rs3798347-T and rs10947563-A) were more frequent in BPD subjects with history of physical abuse and emotional neglect and two *CRHR2* variants (rs4722999-C and rs12701020-C) in BPD subjects with sexual and physical abuse. Our findings suggest a contribution of HPA axis genetic variants to BPD pathogenesis and reinforce the hypothesis of the modulating effect of childhood trauma in the development of this disorder.

**Keywords** Borderline personality disorder · Hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA) axis · Childhood trauma · Genetics · Polymorphisms · Etiology

## Introduction

According to current theories, borderline personality disorder (BPD) results from the interaction between genetically based biological vulnerabilities and psychosocial factors

✉ Juan C. Pascual  
jpascual@santpau.cat

<sup>1</sup> Department of Psychiatry, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Institut d'Investigació Biomèdica - Sant Pau (IIB-Sant Pau), Av. Sant Antoni M<sup>a</sup> Claret 167, 08025 Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Psychiatry and Legal Medicine Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus de la UAB, Plaza Cívica, s/n, Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain

<sup>3</sup> Department of Psychiatry, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Paseo de la Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain

<sup>4</sup> Fundació Docència i Recerca Mutua Terrassa, St. Antoni 19, 08221 Terrassa, Barcelona, Spain

<sup>5</sup> Department of Psychiatry and Mental Health, Consorci Sanitari de l'Anoia, Avenida Catalunya 11, Igualada, 08700 Barcelona, Spain

<sup>6</sup> Institut of Neurosciences, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus de la UAB, Plaza Cívica, s/n, Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain

<sup>7</sup> Psychiatric Genetics Unit, Vall d'Hebron Research Institut, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Paseo de la Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain

<sup>8</sup> Genetics Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, U705, CIBERER, Av. Sant Antoni M<sup>a</sup> Claret 167, 08025 Barcelona, Spain

[1]. The high prevalence of childhood traumatic events in subjects with BPD has led to consider this factor as the main psychosocial event involved in its development [1–3]. Prospective studies with large cohorts of abused/neglected children support this assumption [4–6]. Furthermore, an association between childhood traumas and BPD severity in adulthood has been observed [7].

However, the knowledge on the biological factors involved is still scarce. As BPD is a heterogeneous disorder with several symptomatic domains such as impulsivity, affective instability and problems in interpersonal relationships, different biological systems have been suggested to be involved in its aetiology [1]. For instance, impulsivity, affective instability and suicidality have been related to the serotonergic system; impulsivity and psychotic-like symptoms with the dopaminergic system; and dysphoric affect with the noradrenergic system [8]. Dysfunction of the hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA) axis has also been related to BPD, as this system is one of the main effectors of the stress response [9].

Previous genetic association studies in individuals with BPD have mainly focused on serotonergic and dopaminergic systems, exploring the presence of risk polymorphisms in genes like the serotonin transporter (*SCL6A4*), serotonin receptors, tryptophan hydroxylase I (*TPH1*) and II (*TPH2*), dopamine transporter (*SLC6A3*), dopamine receptors, dopadecarboxylase, monoamine oxidase A (MAO-A) and catecholamine-O-methyltransferase (COMT; for a revision [10, 11]). Results have been inconclusive, probably caused by small sample sizes and the analysis of a limited number of polymorphisms. Gene–environment interaction (GxE) studies have also focused on these monoaminergic systems. Several significant associations have been reported, but the findings still lack replication. Wagner et al. [12] have shown that childhood sexual abuse may modulate the association between the short allele of a polymorphism in the promoter region of *SCL6A4* and impulsivity, between the COMT Val 158 Met variant and aggressiveness [13, 14] and between the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val 66 Met polymorphism and impulsivity [15]. Wilson et al. [16] have reported that genetic variants of *TPH1* may modulate the association between childhood abuse and the degree of BPD in adulthood.

Despite the vulnerability of the HPA axis to early stress [17, 18] and its involvement in BPD pathogenesis [19], only a few studies on the contribution of HPA axis genetic alterations have been published [20–22]. These studies all focus on epigenetic mechanisms, while the presence of risk sequence polymorphisms has not been investigated. HPA genetic variants have been associated with other mental disorders closely related to BPD, such as depression [23–26] and post-traumatic stress disorder [27, 28], and some of these associations are modulated by childhood trauma

[24, 25, 27, 28]. The presence of polymorphisms in HPA axis genes may also contribute to the development of BPD, and this contribution may be modulated by early stressful experiences.

The main objectives of this study were to investigate the contribution of genetic variants in the HPA axis and to explore the modulating effect of childhood trauma in a large sample of BPD patients and controls.

## Materials and methods

### Participants

A sample of 481 subjects with BPD and 442 ethnically matched controls was recruited in three hospitals in Spain with specific BPD units with experience in research and clinical management of this disorder. These BPD units are part of Spain's National Mental Health Service and provide free medical attention with a specialist treatment programme for outpatients with BPD. Subjects were consecutively recruited between 2002 and 2013, among those BPD patients admitted to these units during this time period who met the inclusion criteria. All participants were Caucasians of European descent from the same geographic area (Catalonia, Spain).

Patients were included if they met DSM-IV criteria for BPD according to two semi-structured diagnostic interviews, the Spanish validated versions of both the Structured Clinical Interview for Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-IV (DSM-IV) Axis II Disorders (SCID-II) [29] and the Revised Diagnostic Interview for Borderlines (DIB-R) [30]. Comorbidity with axis I disorders was allowed, but patients had to be stable from these pathologies at the time of inclusion. Although they could also present other personality disorders, BPD was the main diagnosis. Inclusion criteria for the BPD group consisted of: (a) diagnosis of BPD according to DSM-IV criteria; (b) no current episode of any axis I disorders according to DSM-IV criteria, including substance dependence; and (c) no severe physical conditions such as organic brain syndrome, neurological disease or mental deficiency. Experienced psychiatrists carried out a clinical interview to collect sociodemographic and clinical variables. BPD group included mainly female patients (84 %), with a mean age of 30 years (SD 7.3) and a clinical profile of moderate severity according to DIB-R total score (Table 1).

A subgroup of the BPD sample ( $N = 154$ ) filled in the Childhood Trauma Questionnaire—Short Form (CTQ-SF) [31], a self-administered questionnaire designed to assess traumatic experiences in childhood. This subgroup consisted of those patients recruited since 2009. Nearly 75 % of these subjects reported having suffered a moderate–severe traumatic experience in childhood: 94 subjects

**Table 1** Demographic and clinical characteristics of BPD subjects

Variables	BPD subjects (N = 481)
<b>Demographic</b>	
Age [mean (SD)]	30.05 (7.30)
Women [n (%)]	404 (84 %)
<b>Clinical</b>	
Revised diagnostic interview for borderlines (DIB-R)	
Total score [mean (SD)]	7.39 (1.24)
Affect [mean (SD)]	1.57 (0.51)
Cognition [mean (SD)]	0.96 (0.67)
Impulsivity [mean (SD)]	2.32 (0.78)
Interpersonal relationships [mean (SD)]	2.54 (0.68)
Structured clinical interview for DSM-IV Axis II personality disorders (SCID-II)	
Paranoid PD [n (%)]	127 (26.4 %)
Schizoid PD [n (%)]	7 (1.5 %)
Schizotypal PD [n (%)]	15 (3.1 %)
Antisocial PD [n (%)]	73 (15.2 %)
Histrionic PD [n (%)]	45 (9.4 %)
Narcissistic PD [n (%)]	29 (6.0 %)
Avoidant PD [n (%)]	104 (21.6 %)
Dependent PD [n (%)]	93 (19.3 %)
Obsessive–compulsive PD [n (%)]	90 (18.7 %)

(61 %) emotional abuse, 40 subjects (26 %) physical abuse, 59 subjects (38 %) sexual abuse, 70 subjects (45 %) emotional neglect and 37 subjects (24 %) physical neglect.

The control group comprised 442 participants randomly selected from blood donors recruited from general population from the same geographic region as the patients. This group included 82 % of females ( $N = 364$ ) with a mean age of 53.5 years (SD 18.6). In our country, blood donation is a selfless act fairly widespread among population. Injecting drug users and people suffering from chronic diseases are rejected as donors; however, psychopathology or history of childhood trauma was not evaluated in this group.

The total sample has a statistical power of  $\geq 95$  % to detect genetic associations with a moderate genetic effect [odds ratios (O.R.)  $\geq 2$ , minor allele frequency, MAF  $\geq 0.05$ ]. For comparisons with childhood traumas subgroups ( $N = 154$  BPD with or without childhood traumas and  $N = 442$  controls), our sample has 45–95 % power to detect associations with a small ( $w = 0.1$ ) or moderate ( $w = 0.3$ ) effect size, respectively ( $\alpha = 0.05$ ).

This study was approved by the clinical research ethics committee of the three collaborating hospitals, and the principles outlined in the Declaration of Helsinki were followed. The participants did not receive any retribution, and an informed consent form to participate in the study was acquired.

## Assessment instruments

- *Structured clinical interview for DSM-IV axis II personality disorders* (SCID-II) [29]: semi-structured interview to assess personality disorders according to DSM-IV criteria. The Spanish version has good discrimination between axis II personality disorders, as well as good reliability between raters as indicated by an overall kappa of 0.85.
- *Revised diagnostic interview for borderlines* (DIB-R) [30]: semi-structured interview to diagnose BPD within the last 2 years. This interview also provides a measure of the severity of the disorder. The Spanish version has shown good psychometric properties regarding internal consistency (Cronbach's alpha 0.89), sensitivity (0.81) and specificity (0.94). The interviewers were experienced psychologists and presented a high inter-rater reliability (within-class correlation 0.94). The inter-test-reliability of DIB-R and SCID-II was moderate (kappa 0.59).
- *Childhood trauma questionnaire-short form* (CTQ-SF) [31]: questionnaire designed to retrospectively assess childhood abuse and neglect. The short version (CTQ-SF) includes 28 items, and its validity in clinical and non-referred populations has been tested. This questionnaire assesses five types of childhood trauma: sexual, physical and emotional abuse, as well as physical and emotional neglect. Each item is rated on a five-point Likert-type scale ranging from never true to very often true. The questionnaire provides an overall rating and a specific score for every subscale (from 5 to 25), as well as cut-off points to classify each trauma according to the severity of the exposure (none, mild, moderate and severe). As proposed in previous studies [32], we considered a positive history of trauma if severity was at least moderate (i.e. cut-off scores of 8 or higher for sexual abuse, 10 or higher for physical abuse, 13 or higher for emotional abuse, 10 or higher for physical neglect and 15 or higher for emotional neglect).

## Genotyping

Blood samples were systematically collected by standard techniques from the subjects upon admittance to the unit. Genomic DNA was extracted from peripheral leucocytes by using the salting out procedure (Autopure, Qiagen) [33].

Forty-seven informative polymorphisms (tag single-nucleotide polymorphisms—SNPs) in ten HPA genes (*AVPR1A*, *AVPR1B*, *CRH-BP*, *CRHR1*, *CRHR2*, *FKBP5*, *GCR*—alternative name *NR3C1*, *NPY*, *NPY1R* and *NYP2R*) were chosen using the HapMap programme ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)) and the parameters  $r^2 = 0.80$  and MAF = 0.05. Table 2 includes a list of the HPA genes and SNPs investigated.

**Table 2** Summary of single-marker analyses comparing cases versus controls

Gene	SNP	BPD group	Controls	$\chi^2$	<i>p</i>	O.R.
<i>AVRPIA</i>	rs7298346	0.12	0.13	0.43	0.50	0.91
	rs1042615	0.39	0.37	0.42	0.51	1.06
	rs10877968	0.16	0.16	0.16	0.68	1.05
<i>AVRP1B</i>	rs28373064	0.17	0.15	0.67	0.41	1.10
<i>CRH-BP</i>	rs32897	0.16	0.17	0.56	0.45	0.91
	rs10062367	0.20	0.20	0.13	0.71	0.95
	rs10514082	0.15	0.15	0.001	0.96	1.00
<i>CRHR1</i>	rs1053989	0.39	0.40	0.01	0.90	0.98
	rs110402	0.37	0.37	0.001	0.96	0.99
	rs173365	0.46	0.47	0.17	0.67	0.96
<i>CRHR2</i>	rs242942	0.13	0.10	2.48	0.11	1.25
	rs2664008	0.06	0.07	0.64	0.42	0.86
	rs12944712	0.50	0.49	0.15	0.69	1.03
	rs17763104	0.09	0.08	0.43	0.51	1.11
	rs17763533	0.26	0.28	1.13	0.28	0.89
	rs929377	0.36	0.32	2.79	0.09	1.18
	rs975537	0.19	0.18	0.42	0.51	1.08
	rs2190242	0.22	0.20	0.89	0.34	1.11
	rs2267716	0.26	0.24	0.63	0.42	1.09
	rs2267717	0.10	0.10	0.04	0.83	0.96
<i>FKBP5</i>	rs2284217	0.18	0.17	0.22	0.63	1.05
	rs2284218	0.38	0.36	0.87	0.34	1.09
	rs4722999	0.33	0.29	2.87	0.09	1.18
	rs6965973	0.12	0.12	0.06	0.79	1.03
	rs12701020	0.16	0.17	0.14	0.70	0.95
	rs3777747	0.42	0.45	0.95	0.32	0.91
	rs3798346	0.20	0.17	2.62	0.10	1.21
	rs3798347	0.33	0.35	0.47	0.48	0.93
	<b>rs4713902</b>	<b>0.23</b>	<b>0.27</b>	<b>4.31</b>	<b>0.03</b>	<b>0.79</b>
	rs9380526	0.36	0.37	0.11	0.73	0.96
<i>GCR (NR3C1)</i>	rs17614642	0.06	0.06	0.16	0.68	0.92
	rs10947563	0.31	0.33	0.65	0.41	0.92
	<b>rs9470079</b>	<b>0.16</b>	<b>0.12</b>	<b>6.06</b>	<b>0.01</b>	<b>1.39</b>
	rs852977	0.29	0.31	1.05	0.30	0.90
	rs2963155	0.19	0.19	0.02	0.87	0.98
	rs4912905	0.27	0.26	0.42	0.51	1.07
	rs9324918	0.12	0.14	2.01	0.15	0.82
	rs10041520	0.51	0.48	1.49	0.22	1.12
	rs17100236	0.13	0.13	0.06	0.80	1.03
	rs17287745	0.38	0.38	<0.001	0.99	1.00
<i>NPY</i>	rs17339831	0.17	0.17	0.02	0.88	0.98
	rs16138	0.30	0.27	1.62	0.20	1.14
	rs5574	0.43	0.47	3.06	0.07	0.84
<i>NPY1R</i>	rs4552421	0.10	0.10	0.25	0.61	1.08
	rs4691075	0.13	0.13	0.14	0.70	1.05
	rs9764	0.26	0.24	0.64	0.42	1.09
<i>NPY2R</i>	rs1047214	0.46	0.48	0.67	0.40	0.92

Significant polymorphisms are highlighted in bold

*AVRPIA* arginine vasopressin receptor 1A, *AVRP1B* arginine vasopressin receptor 1B, *CRH-BP* corticotropin-releasing hormone-binding protein, *CRHR1* corticotropin-releasing hormone receptor 1, *CRHR2* corticotropin-releasing hormone receptor 2, *FKBP5* KF 506-binding protein, *GCR* glucocorticoid receptor, *NPY* neuropeptide Y, *NPY1R* neuropeptide Y receptor 1, *NPY2R* neuropeptide Y receptor 2 *O.R.* odds ratio BPD/controls



Genotyping of the selected polymorphisms was performed using real-time PCR technology and Taqman Custom open arrays. All the investigated polymorphisms successfully underwent genotyping quality controls (calling rate >95 % across SNPs and individuals).

### Statistical analysis

Single-marker analyses were performed using Chi-square and regression analyses to investigate associations with bimodal and categorical variables, respectively. Phased (using the E–M algorithm) haplotype analyses including all SNPs within a gene were performed (data available on request). The statistical packages SPSS (IBM, v20.0), PLINK (v1.07) and EpiInfo (v7.0.8.3, developed by Centres for Disease Control, USA) were used. This study was exploratory in nature, and Bonferroni corrections for multiple analyses were not used.

## Results

### Association between SNPs of the HPA axis and BPD

All polymorphisms genotyped were in Hardy–Weinberg equilibrium, except the *CRHR1* rs173365 variant where an excess of individuals homozygotes was detected ( $p = 0.02$ ).

Table 2 summarizes the results of the case–control association analyses. Two *FKBP5* polymorphisms (rs4713902 and rs9470079) showed significant associations with risk of BPD: the rs4713902-C allele was relatively more frequent in healthy controls than in BPD subjects (27 vs. 23 %,  $p = 0.03$ , O.R. = 0.79), and the rs9470079-A variant was relatively more frequent in BPD subjects than in controls (16 vs. 12 %,  $p = 0.01$ , O.R. = 1.39; Fig. 1). Haplotype comparisons between affected and controls showed significant differences in the frequency distribution of *FKBP5* (GATTTAAT;  $p = 0.016$ ) and *CRHR1* (GATGAGT;  $p = 0.002$ ) allele combinations (see Table 3, full haplotype data available on request).

### Modulating effect of childhood trauma

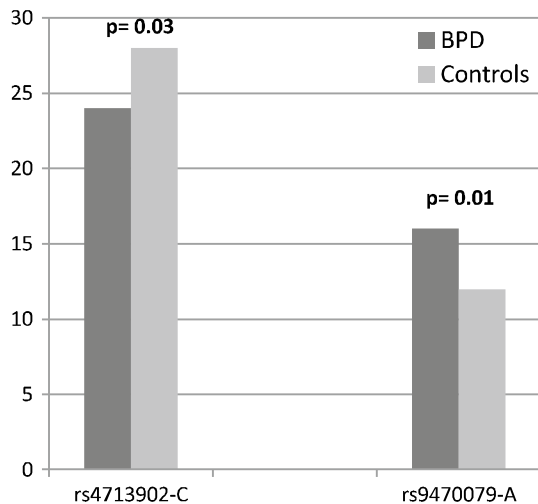
Table 4 summarizes the results of the association analyses considering the presence or absence of childhood trauma. To discern the influence of traumas on the associations, samples were divided into three groups for each type of trauma: BPD patients with childhood trauma, BPD patients without trauma and controls. Only BPD patients with data on childhood trauma ( $N = 154$ ) were included in these analyses. Linear regression analyses were performed using an additive model to compare the allele dosage distribution

between the three groups. Single-marker comparisons between the three groups revealed clearer results than the comparisons between patients and controls in spite of the reduced sample sizes. Several *CRHR2* variants were more frequent in patients with childhood sexual abuse (rs4722999,  $p = 0.05$ ) and physical abuse (rs4722999,  $p = 0.03$  and rs12701020,  $p = 0.03$ ) than in patients without and controls. *FKBP5* polymorphisms were also relatively more frequent in patients who reported childhood physical abuse (rs3798347,  $p = 0.03$  and rs10947563,  $p = 0.02$ ) and emotional neglect (rs3798347,  $p = 0.05$  and rs10947563,  $p = 0.01$ ). Finally, a marginal association was detected between a *GCR* variant and the three groups classified according to emotional neglect (rs852977,  $p = 0.04$ ). In general, the risk allele was relatively more frequent in those BPD patients that reported childhood abuse or neglect than in patients without BPD trauma, suggesting a modulation of the association by the presence of environmental factors such as traumas. Figure 2 shows these associations according to the type of traumatic event (Fig. 2a: sexual abuse, Fig. 2b: physical abuse and Fig. 2c: emotional neglect). It is important to note that none of the reported associations would survive conservative Bonferroni corrections for multiple analyses.

## Discussion

The aim of this study was to explore the influence of genetic variants in the HPA axis on the risk of BPD and the modulator effect of traumatic experiences in childhood. Our results showed that polymorphic variants in *FKBP5* and *CRHR* genes may be associated with BPD diagnosis. These associations were clearer when the presence of childhood traumas was considered. These results are suggestive of a genetic involvement of the HPA axis in the development of BPD, in combination with environmental factors.

When comparing single-marker frequencies in BPD patients versus controls, two *FKBP5* genetic polymorphisms, rs4713902 and rs9470079, showed significant association with BPD. Haplotype analyses confirmed the association of *FKBP5* genetic variants with risk of BPD. *FKBP5* encodes the FK506-binding protein 5, which is involved in the regulation of glucocorticoid receptors by decreasing the affinity of this receptor for its ligand, reducing the expression of GR-responsive genes [34, 35]. Genetically based disturbances in FK506 function have been linked to dysfunctions in HPA axis, both in the general population [36] and in patients with stress-related disorders [37]. Additionally, FK506 function alterations have been linked to psychiatric disorders such as major depression which, like BPD, are characterized by disturbances in HPA axis [38, 39]. Although the polymorphisms associated



**Fig. 1** Distribution of allelic frequencies of *FKBP5* polymorphisms associated with BPD

with BPD are intronic variants of unknown functionality, our results suggest a possible involvement of *FKBP5* in the aetiology of BPD.

Although no individual *CRHR1* polymorphism was related to BPD, a clear association between a *CRHR1* haplotype and BPD risk was detected. This pituitary receptor is a major component of the HPA axis and of the initial response to stress. It mediates the stimulatory action of corticotrophin-releasing hormone (CRH) on adreno-corticotrophic hormone (ACTH) secretion. Therefore, *CRHR1* deficiency leads to impaired stress response [40, 41]. *CRHR1* polymorphisms have been previously associated with depressive disorders [26, 42, 43] and with suicidal and aggressive behaviours, symptoms frequently observed in

subjects with BPD [44, 45]. Our results may support the hypothesis of the involvement of *CRHR1* on BPD.

Clearer results were observed when considering the presence of childhood trauma in BPD patients. When dividing the sample into three groups (patients with childhood trauma, patients without and controls), the risk alleles of two *FKBP5* polymorphisms, rs3798347-T and rs10947563-A, were more frequently represented in patients with a history of childhood physical abuse and emotional neglect than in patients without and controls, with other variants in the same gene presenting similar trends towards association with BPD patients with a history of sexual and physical abuse and of physical and emotional neglect. Two *CRHR2* polymorphisms were also differently distributed in patients who had suffered physical and sexual abuse in comparison with patients without physical abuse and controls (rs4722999-C and rs12701020-C), with other *CRHR2* variants showing trends towards association with other traumas. Additionally, a GCR variant, rs852977-G, was differently distributed in the three groups according to emotional neglect. All these associations with BPD risk alleles were more evident when a childhood trauma had happened, suggesting a reinforcing interaction with the genetic propensity to develop BPD. It should be noted that the polymorphisms associated with BPD and history of childhood trauma did not show significant differences when comparing BPD patients and controls. Aside from a spurious finding or a difference in sample sizes, this may be the result of the modulator effect of childhood trauma.

A modulation of several HPA axis genes' polymorphisms by childhood traumatic events has been described in other psychiatric disorders and conditions closely related to BPD. For instance, GxE involving *FKBP5* polymorphisms has been reported in PTSD [27, 28], depression

**Table 3** Summary of haplotype comparisons between patients and controls

Locus	Haplotype	FA	FU	$\chi^2$	df	p	SNPs
<i>NPY</i>	TG	0.4384	0.4814	3.372	1	0.06	rs5574   rs16138
<i>NPY1R</i>	TGT	0.5955	0.6161	0.8035	1	0.37	rs9764   rs4552421   rs4691075
<i>CRH-BP</i>	CAAA	0.01049	0.01944	2.504	1	0.11	rs32897   rs10062367   rs10514082   rs1053989
<i>CRHR1</i>	GATGAGT	0.05213	0.02474	8.954	1	0.002	rs110402   rs173365   rs242942   rs2664008   rs12944712   rs17763104   rs17763533
<i>CRHR2</i>	TAAATGGTTCC	0.4351	0.4692	1.909	1	0.16	rs929377   rs973002   rs975537   rs2190242   rs2267716   rs2267717   rs2284217   rs2284218   rs4722999   rs6965973   rs12701020
<i>AVRPIA</i>	TGC	0.04609	0.03269	2.129	1	0.14	rs7298346   rs1042615   rs10877968
<i>GCR</i>	AAGTCCAG	0.05851	0.07641	2.293	1	0.13	rs852977   rs2963155   rs4912905   rs9324918   rs10041520   rs17100236   rs17287745   rs17339831
<i>FKBP5</i>	GATTTAAT	0.1591	0.1197	5.727	1	0.016	rs3777747   rs3798346   rs3798347   rs4713902   rs9380526   rs9470079   rs10947563   rs17614642

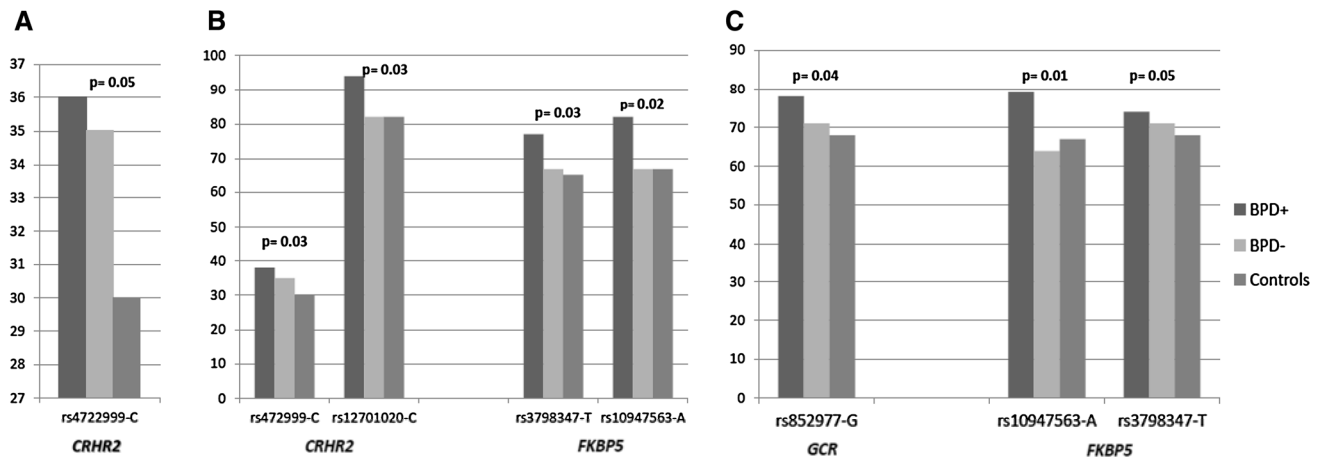
*AVRPIA* arginine vasopressin receptor 1A, *CRH-BP* corticotrophin-releasing hormone-binding protein, *CRHR1* corticotrophin-releasing hormone receptor 1, *CRHR2* corticotrophin-releasing hormone receptor 2, *FKBP5* KF 506-binding protein, *GCR* glucocorticoid receptor, *NPY* neuropeptide Y, *NPY1R* neuropeptide Y receptor 1, FA frequency in affected, FU frequency in unaffected

**Table 4** Summary of results of comparisons between three groups: patients with and without childhood traumas, and controls

GENE	SNP	Sexual abuse <i>p</i> (Beta)	Physical abuse <i>p</i> (Beta)	Emotional abuse <i>p</i> (Beta)	Physical neglect <i>p</i> (Beta)	Emotional neglect <i>p</i> (Beta)
<i>AVPR1A</i>	rs7298346-A	0.16 (−0.08)	0.489 (−0.03)	0.30 (−0.06)	0.57(−0.03)	0.43 (−0.06)
	rs1042615-A	0.48 (0.02)	0.41 (0.03)	0.26 (0.05)	0.58 (0.02)	0.72 (0.02)
	rs10877968-C	0.39 (−0.04)	0.78 (−0.01)	0.50 (−0.04)	0.99 (<0.001)	0.99 (<0.001)
<i>AVPR1B</i>	rs28373064-G	0.15 (0.07)	0.18 (0.06)	0.28 (0.06)	0.26 (0.06)	0.17 (0.09)
<i>CRH-BP</i>	rs32897-C	0.54 (−0.03)	0.46 (−0.03)	0.45 (−0.04)	0.60 (−0.02)	0.81 (0.01)
	rs10062367-A	0.66(−0.02)	0.38 (−0.03)	0.33 (−0.05)	0.17 (−0.06)	0.50 (−0.04)
<i>CRHR1</i>	rs10514082-G	0.80 (0.01)	0.89(−0.006)	0.76 (−0.02)	0.61 (−0.02)	0.93 (−0.006)
	rs1053989-A	0.94(−0.002)	0.50 (−0.02)	0.49 (−0.03)	0.50 (−0.03)	0.74 (−0.01)
	rs110402-A	0.27 (0.04)	0.38 (0.03)	0.14 (0.07)	0.22 (0.05)	0.32 (0.05)
	rs173365-G	0.88 (−0.005)	0.94 (−0.002))	0.69 (0.01)	0.98 (0.001)	0.68 (0.02)
	rs242942-T	0.64 (0.03)	0.58 (0.03)	0.34 (0.07)	0.55 (0.04)	0.86 (0.01)
<i>CRHR2</i>	rs2664008-A	0.63 (−0.03)	0.72 (−0.02)	0.95 (−0.004)	0.98 (0.002)	0.48 (−0.08)
	rs12944712-A	0.34 (−0.03)	0.47 (−0.02)	0.22 (−0.05)	0.22 (−0.05)	0.57 (−0.03)
	rs17763104-A	0.35 (−0.06)	0.42 (−0.05)	0.59 (−0.04)	0.69 (−0.02)	0.80 (0.02)
	rs17763533-C	0.89 (−0.005)	0.77 (−0.01)	0.31 (−0.04)	0.43 (−0.03)	0.90 (−0.007)
	rs929377-A	0.20 (0.05)	0.12 (0.05)	0.35 (0.04)	0.41 (0.03)	0.35 (0.05)
	rs975537-T	0.08 (0.08)	0.07 (0.07)	0.29 (0.06)	0.48 (0.03)	0.11 (0.10)
	rs2190242-C	0.14 (0.06)	0.12 (0.06)	0.32 (0.05)	0.38 (0.04)	0.18 (0.08)
	rs2267716-C	0.65 (0.02)	0.31 (0.04)	0.29 (0.05)	0.51 (0.03)	0.59 (0.03)
	rs2267717-A	0.24 (0.07)	0.56 (0.03)	0.93 (0.005)	0.97 (−0.002)	0.51 (0.05)
	rs2284217-A	0.09 (0.08)	0.13 (0.06)	0.45 (0.04)	0.51 (0.03)	0.12 (0.10)
<i>FKBP5</i>	rs2284218-C	0.18 (0.05)	0.11(0.06)	0.23 (0.05)	0.49 (0.03)	0.22 (0.06)
	<b>rs4722999-C</b>	<b>0.05 (0.08)</b>	<b>0.03 (0.08)</b>	0.15 (0.06)	0.26 (0.05)	0.08 (0.10)
	rs6965973-T	0.22 (0.07)	0.36 (0.04)	0.80 (0.02)	0.94 (0.004)	0.33 (0.07)
	<b>rs12701020-T</b>	0.09 (−0.08)	<b>0.03 (−0.09)</b>	0.10 (−0.09)	0.13 (−0.08)	0.08 (−0.12)
	rs3777747-G	0.74 (0.01)	0.19 (0.04)	0.60 (0.02)	0.89 (0.006)	0.28 (0.05)
	rs3798346-G	0.09 (0.09)	0.16 (0.06)	0.12 (0.08)	0.11 (0.09)	0.09 (0.11)
	<b>rs3798347-A</b>	0.12 (−0.06)	<b>0.03 (−0.08)</b>	0.15 (−0.06)	0.30 (−0.04)	<b>0.05 (−0.11)</b>
	rs4713902-C	0.59 (−0.02)	0.80 (0.01)	0.83 (0.01)	0.53 (−0.03)	0.84 (0.01)
	rs9380526-C	0.20 (−0.05)	0.06 (−0.06)	0.22 (−0.05)	0.35 (−0.04)	0.06 (−0.10)
	rs17614642-C	0.81 (−0.01)	0.87 (−0.01)	0.75 (−0.03)	0.76 (0.03)	0.36 (0.09)
<i>GCR (NR3C1)</i>	<b>rs10947563-G</b>	0.10 (−0.06)	<b>0.02 (−0.08)</b>	0.10 (−0.07)	0.09 (−0.07)	<b>0.01 (−0.13)</b>
	rs9470079-A	0.13 (0.08)	0.09 (0.08)	0.33 (0.06)	0.28 (0.06)	0.12 (0.11)
	<b>rs852977-G</b>	0.06 (−0.07)	0.09 (−0.06)	0.15 (−0.06)	0.29 (−0.04)	<b>0.04 (0.11)</b>
	rs2963155-G	0.68 (−0.02)	0.96 (−0.001)	0.83 (−0.01)	0.89 (−0.007)	0.62 (−0.03)
	rs4912905-C	0.15 (0.06)	0.16 (0.05)	0.13 (0.07)	0.23 (0.05)	0.15 (0.08)
	rs9324918-C	0.35 (−0.05)	0.31 (−0.05)	0.44 (−0.05)	0.34 (−0.05)	0.15 (−0.11)
	rs10041520-C	0.22 (0.04)	0.15 (0.05)	0.27 (0.05)	0.29 (0.04)	0.11 (0.08)
	rs17100236-C	0.77 (−0.01)	0.98 (−0.001)	0.64 (−0.03)	0.73 (−0.02)	0.68 (−0.03)
	rs17287745-G	0.30 (−0.04)	0.31 (−0.03)	0.35 (−0.04)	0.58 (−0.02)	0.51 (−0.03)
	rs17339831-C	0.06 (−0.09)	0.12 (−0.07)	0.14 (−0.08)	0.45 (−0.04)	0.12 (−0.11)
<i>NPY</i>	rs16138-C	0.29 (0.04)	0.40 (0.03)	0.27 (0.05)	0.55 (0.03)	0.57 (0.03)
	rs5574-T	0.22 (0.05)	0.49 (−0.02)	0.18 (−0.05)	0.33 (−0.04)	0.52 (−0.03)
<i>NPY1R</i>	rs4552421-A	0.79 (0.01)	0.60 (0.03)	0.65 (0.03)	0.61 (0.03)	0.19 (0.10)
	rs4691075-C	0.80 (0.01)	0.64 (0.02)	0.77 (0.01)	0.71 (0.02)	0.20 (0.09)
<i>NPY2R</i>	rs9764-C	0.67 (−0.01)	0.44 (−0.03)	0.67 (−0.02)	0.80 (−0.01)	0.68 (−0.02)
	rs1047214-C	0.73 (−0.01)	0.78 (0.01)	0.72 (0.01)	0.74 (0.01)	0.90 (0.006)

Significant polymorphisms are highlighted in bold. Beta values are referred to the minor alleles. A positive beta value indicates that the minor allele contributes to an increased risk

*AVPR1A* arginine vasopressin receptor 1A, *AVPR1B* arginine vasopressin receptor 1B, *CRH-BP* corticotropin-releasing hormone-binding protein, *CRHR1* corticotropin-releasing hormone receptor 1, *CRHR2* corticotropin-releasing hormone receptor 2, *FKBP5* KF 506-binding protein, *GCR* glucocorticoid receptor, *NPY* neuropeptide Y, *NPY1R* neuropeptide Y receptor 1, *NPY2R* neuropeptide Y receptor 2



**Fig. 2** Distribution of allelic frequencies in patients with history of trauma (BPD+), patients without (BPD−) and controls, according to a sexual abuse, b physical abuse and c emotional neglect

[46], suicide [47] and aggressive behaviour [48]. As far as we are aware, no GxE studies concerning *CRHR2* have been published. However, an involvement of this gene in BPD pathogenesis is plausible since it is the receptor for urocortin, one of the effectors of the stress response [49], and *CRHR2* deficiency leads to anxiety-like behaviours in mice [50]. Additionally, *CRHR2* polymorphisms have been associated with suicidal behaviour [51] and depression [26]. Regarding *GCR* (*NR3C1*), recent studies have observed association of childhood trauma with a higher level of methylation of this gene in subjects with BPD [21, 22]. None of the mentioned studies included the polymorphisms investigated in our sample. Therefore, a direct comparison of risk alleles is not possible. In summary, these results suggest an involvement of *FKBP5* and *CRHR2* genes and may indicate GxE interactions in the development of BPD.

Current evidence shows that GxE has a central role in the pathogenesis of psychiatric disorders, and some of these genetic–environmental interactions are common to several disorders. For instance, the interaction between childhood trauma and HPA axis genes seems to be involved in the development of not only BPD but also other psychiatric conditions [49]. This evidence supports the assumption that HPA genetic variants would confer an intrinsic vulnerability for the development of psychopathology which would be modulated by environmental factors such as childhood traumatic events. Possibly, neither a concrete polymorphism or gene nor a particular traumatic event is exclusively associated with a specific psychiatric disorder, but the expression of one or another pathology may depend on the combination of a particular genotype with several environmental factors.

Our study has several limitations. First, childhood maltreatment information was retrospectively self-reported, although by means of a questionnaire (CTQ-SF) widely used in psychiatric research. Since this information was not collected in all participants nor in controls, we were only able to do an assessment of the modulator effect of childhood traumas rather than a direct study of their contribution to BPD risk. Moreover, the sample size of BPD subjects with childhood trauma information was relatively small. However, the findings are promising and could be used as a guide for further studies in larger samples. Second, the evaluation of current episodes of axis I disorders was performed by means of a clinical interview conducted by experienced psychiatrists instead of a psychometric instrument. Third, sociodemographic information of both the BPD and the control groups is scarce. Fourth, no psychiatric evaluation was performed in the control group, so the absence of subjects with BPD in this sample cannot be assured. Fifth, most of the reported findings will not survive restrictive Bonferroni corrections for multiple analyses, although this type of correction assumes that the polymorphisms investigated are independent events, and may be too conservative when using tag-SNPs. In consequence, our results should be interpreted with caution. Although they seem to suggest that genetic variants in the HPA axis may be involved in the development of BPD, and may be modulated by childhood traumatic events, they need to be replicated in independent studies to confirm their validity. Finally, the long duration of the present study precludes from ensuring the inter-rater reliability between all the researchers. Nevertheless, the main interviewers were experienced clinical researchers with a high inter-rater reliability (within-class correlation 0.94).

## Conclusions

In summary, to our knowledge, these results are the first to suggest a possible contribution of HPA genetic variants to BPD pathogenesis and a modulating effect of childhood trauma in the development of this disorder. However, these findings are preliminary and need to be replicated in independent studies. If confirmed, these findings may have clinical implications, as a better understanding of the link between genetic vulnerabilities, negative childhood events and the development of BPD symptoms is mandatory to guide future treatment and prevention strategies for this disorder.

**Acknowledgments** This study was supported by Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM) and by a grant from Instituto de Salud Carlos III (PI10/00253 and PI11/00725).

**Conflict of interest** None of the authors declare any biomedical financial interests or other potential conflicts of interest.

## References

- Leichsenring F, Leibing E, Kruse J, New AS, Leweke F (2011) Seminar borderline personality disorder. *Lancet* 377:74–84. doi:10.1016/S0140-6736(10)61422-5
- Zanarini MC, Frankenburg FR (1997) Pathways to the development of borderline personality disorder. *J Personal Disord* 11:93–104. doi:10.1521/pedi.1997.11.1.93
- Crowell SE, Beauchaine TP, Linehan MM (2009) A biosocial developmental model of borderline personality: elaborating and extending Linehan's theory. *Psychol Bull* 135:495–510. doi:10.1037/a0015616
- Johnson JG, Cohen P, Brown J, Smailes EM, Bernstein DP (1999) Childhood maltreatment increases risk for personality disorders during early adulthood. *Arch Gen Psychiatry* 56:600–606. doi:10.1001/archpsyc.56.7.600
- Spataro J, Mullen PE, Burgess PM, Wells DL, Moss SA (2004) Impact of child sexual abuse on mental health: prospective study in males and females. *Br J Psychiatry* 184:416–421. doi:10.1192/bjp.184.5.416
- Widom CS, Czaja SJ, Paris J (2009) A prospective investigation of borderline personality disorder in abused and neglected children followed up into adulthood. *J Personal Disord* 23:433–446. doi:10.1521/pedi.2009.23.5.433
- Martín-Blanco A, Soler J, Villalta L, Feliu-Soler A, Elices M, Pérez V, Arranz MJ, Ferraz L, Alvarez E, Pascual JC (2014) Exploring the interaction between childhood maltreatment and temperamental traits on the severity of borderline personality disorder. *Compr Psychiatry* 55:311–318. doi:10.1016/j.comppsy.2013.08.026
- Skodol AE, Siever LJ, Livesley WJ, Gunderson JG, Phol B, Widiger T (2002) The borderline diagnosis II: biology, genetics, and clinical course. *Biol Psychiatry* 51:951–963. doi:10.1016/S0006-3223(02)01325-2
- Nemeroff CB (1999) The preeminent role of early untoward experience on vulnerability to major psychiatric disorders: the nature-nurture controversy revisited and soon to be resolved. *Mol Psychiatry* 4:106–108. doi:10.1038/sj.mp.4000512
- Calati R, Gressier F, Balestri M, Serretti A (2013) Genetic modulation of borderline personality disorder: systematic review and meta-analysis. *J Psychiatr Res* 47:1275–1287. doi:10.1016/j.jpsychires.2013.06.002
- Amad A, Ramoz N, Thomas P, Jardri R, Gorwood P (2014) Genetics of borderline personality disorder: systematic review and proposal of an integrative model. *Neurosci Biobehav Rev* 40:6–19. doi:10.1016/j.neubiorev.2014.01.003
- Wagner S, Baskaya O, Lieb K, Dahmen N, Tadić A (2009) The 5-HTTLPR polymorphism modulates the association of serious life events (SLE) and impulsivity in patients with borderline personality disorder. *J Psychiatr Res* 43:1067–1072. doi:10.1016/j.jpsychires.2009.03.004
- Wagner S, Baskaya O, Anicker NJ, Dahmen N, Lieb K, Tadić A (2010) The catechol o-methyltransferase (COMT) val(158) met polymorphism modulates the association of serious life events (SLE) and impulsive aggression in female patients with borderline personality disorder (BPD). *Acta Psychiatr Scand* 122:110–117
- Wagner S, Baskaya O, Lieb K, Dahmen N, Tadić A (2010) Lack of modulating effects of the COMT Val(158)Met polymorphism on the association of serious life events (SLE) and impulsivity in patients with borderline personality disorder. *J Psychiatr Res* 44:121–122
- Wagner S, Baskaya O, Dahmen N, Lieb K, Tadić A (2010) Modulatory role of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism on the effects of serious life events on impulsive aggression in borderline personality disorder. *Genes, Brain Behav* 9:97–102. doi:10.1111/j.1601-183X.2009.00539
- Wilson S, Stanley B, Brent DA, Oquendo MA, Huang YY, Haghghi F (2012) Interaction between tryptophan hydroxylase I polymorphisms and childhood abuse is associated with increased risk for borderline personality disorder in adulthood. *Psychiatr Genet* 22:15–24. doi:10.1097/YPG.0b013e32834c0c4c
- Heim C (2001) Nemeroff CB (2001) The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry* 50:200–204. doi:10.1016/S0006-3223(01)01157-X
- Carpenter L, Carvalho JP, Tyrka AR, Wier LM, Mello AF, Mello M (2007) Decreased adrenocorticotropic hormone and cortisol responses to stress in healthy adults reporting significant childhood maltreatment. *Biol Psychiatry* 62:1080–1087. doi:10.1016/j.biopsych.2007.05.002
- Wingenfeld K, Spitzer C, Rullkötter N, Löwe B (2010) Borderline personality disorder: hypothalamus pituitary adrenal axis and findings from neuroimaging studies. *Psychoneuroendocrinology* 35:154–170. doi:10.1016/j.psyneuen.2009.09.014
- Dammann G, Teschler S, Haag T, Altmüller F, Tuzek F, Dammann RH (2011) Increased DNA methylation of neuropsychiatric genes occurs in borderline personality disorder. *Epigenetics* 6:1454–1462. doi:10.4161/epi.6.12.18363
- Perroud N, Paoloni-Giacobino A, Prada P, Olié E, Salzmann A, Nicastro R (2011) Increased methylation of glucocorticoid receptor gene (NR3C1) in adults with a history of childhood maltreatment: a link with the severity and type of trauma. *Translational psychiatry* 1:e59. doi:10.1038/tp.2011.60
- Martín-Blanco A, Ferrer M, Soler J, Salazar J, Vega D, Andión O (2014) Association between methylation of the glucocorticoid receptor gene, childhood maltreatment, and clinical severity in borderline personality disorder. *J Psychiatr Res* 57:34–40. doi:10.1016/j.jpsychires.2014.06.011
- van Rossum EF, Binder EB, Majer M, Koper JW, Ising M, Modell S (2006) Polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene and major depression. *Biol Psychiatry* 59:681–688. doi:10.1016/j.biopsych.2006.02.007

24. Bradley R, Binder EB, Epstein MP, Tang Y, Nair HP, Liu W (2008) Influence of child abuse on adult depression: moderation by the corticotropin-releasing hormone receptor gene. *Arch Gen Psychiatry* 65:190–200. doi:[10.1001/archgenpsychiatry.2007.26](https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2007.26)
25. Grabe HJ, Schwahn C, Appel K, Mahler J, Schulz A, Spitzer C (2010) Childhood maltreatment, the corticotropin-releasing hormone receptor gene and adult depression in the general population. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 153:1483–1493. doi:[10.1002/ajmg.b.31131](https://doi.org/10.1002/ajmg.b.31131)
26. Ishitobi Y, Nakayama S, Yamaguchi K, Kanehisa M, Higuma H, Maruyama Y (2012) The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 159B:429–436
27. Binder EB, Bradley RG, Liu W, Epstein MP, Deveau TC, Mercer KB (2008) Association of FKBP5 polymorphisms and childhood abuse with risk of posttraumatic stress disorder symptoms in adults. *JAMA* 299:1291–1305
28. Xie P, Kranzler HR, Poling J, Stein MB, Anton RF, Farrer L (2010) Interaction of FKBP5 with childhood adversity on risk for post-traumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology* 35:1684–1692. doi:[10.1038/npp.2010.37](https://doi.org/10.1038/npp.2010.37)
29. Gómez-Beneyto M, Villar M, Renovell M, Pérez M, Hernández M, Leal C (1994) The diagnosis of personality disorder with a modified version of the SCID-II in a Spanish clinical sample. *J Personal Disord* 8:104–110
30. Barrachina J, Soler J, Campins MJ, Tejero A, Pascual JC, Alvarez E, Zanarini MC, Pérez Sola V (2004) Validation of a Spanish version of the diagnostic interview for bordelines-revised (DIB-R). *Actas españolas Psiquiatr* 32:293–298
31. Bernstein DP, Stein J, Newcomb M, Walker E, Pogge D, Ahluvalia T (2003) Development and validation of a brief screening version of the Childhood Trauma Questionnaire. *Child Abuse Negl* 27:169–190. doi:[10.1016/S0145-2134\(02\)00541-0](https://doi.org/10.1016/S0145-2134(02)00541-0)
32. Heim C, Nater UM, Maloney E, Boneva R, Jones JF, Reeves WC (2009) Childhood trauma and risk for chronic fatigue syndrome: association with neuroendocrine dysfunction. *Arch Gen Psychiatry* 66:72–80. doi:[10.1001/archgenpsychiatry.2008.508](https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2008.508)
33. Miller SA, Dykes DD, Polesky H (1989) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:12–15. doi:[10.1093/nar/16.3.1215](https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215)
34. Wozniak GM, Rüegg J, Abel GA, Schmidt U, Holsboer F, Rein T (2005) FK506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells. *J Biol Chem* 280:4609–4616. doi:[10.1074/jbc.M407498200](https://doi.org/10.1074/jbc.M407498200)
35. Tatro ET, Everall IP, Kaul M, Achim CL (2009) Modulation of glucocorticoid receptor nuclear translocation in neurons by immunophilins FKBP51 and FKBP52: implications for major depressive disorder. *Brain Res* 1286:1–12. doi:[10.1016/j.brainres.2009.06.036](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.06.036)
36. Touma C, Gassen NC, Herrmann L, Cheung-Flynn J, Büll DR, Ionescu IA (2011) FK506 binding protein 5 shapes stress responsiveness: modulation of neuroendocrine reactivity and coping behavior. *Biol Psychiatry* 70:928–936. doi:[10.1016/j.biopsych.2011.07.023](https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.07.023)
37. Mehta D, Gonik M, Klengel T, Rex-Haffner M, Menke A, Rubel J (2011) Using polymorphisms in FKBP5 to define biologically distinct subtypes of posttraumatic stress disorder: evidence from endocrine and gene expression studies. *Arch Gen Psychiatry* 68:901–910. doi:[10.1001/archgenpsychiatry.2011.50](https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.50)
38. Binder EB, Salyakina D, Lichtner P, Wozniak GM, Ising M, Pütz B (2004) Polymorphisms in FKBP5 are associated with increased recurrence of depressive episodes and rapid response to antidepressant treatment. *Nat Genet* 36:1319–1325. doi:[10.1038/ng1479](https://doi.org/10.1038/ng1479)
39. Szczepankiewicz J, Leszczyńska-Rodziewicz A, Pawlak A, Narozna B, Rajewska-Rager M, Wilkosc A (2014) FKBP5 polymorphism is associated with major depression but not with bipolar disorder. *J Affect Disord* 164:33–37. doi:[10.1016/j.jad.2014.04.002](https://doi.org/10.1016/j.jad.2014.04.002)
40. Smith GW, Aubry JM, Dellu F, Contarino A, Bilezikjian LM, Gold LH (1998) Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. *Neuron* 20:1093–1102. doi:[10.1016/S0896-6273\(00\)80491-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80491-2)
41. Timpl P, Spanagel R, Sillaber I, Kresse A, Reul JM, Stalla GK (1998) Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotrophin releasing hormone receptor. *Nat Genet* 19:162–166
42. Liu Z, Zhu F, Wang G, Xiao Z, Wang H, Tang J (2006) Association of corticotropin-releasing hormone receptor1 gene SNP and haplotype with major depression. *Neurosci Lett* 404:358–362. doi:[10.1016/j.neulet.2006.06.016](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.06.016)
43. Engineer N, Darwin L, Nishigandh D, Ngianga-Bakwin K, Smith SC, Grammatopoulos DK (2013) Association of glucocorticoid and type 1 corticotropin-releasing hormone receptors gene variants and risk for depression during pregnancy and post-partum. *J Psychiatr Res* 47:1166–1173. doi:[10.1016/j.jpsychires.2013.05.003](https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2013.05.003)
44. Wasserman D, Sokolowski M, Rozanov V, Wasserman J (2008) The CRHR1 gene: a marker for suicidality in depressed males exposed to low stress. *Genes, Brain Behav* 7:14–19. doi:[10.1111/j.1601-183X.2007.00310.x](https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2007.00310.x)
45. Chen B, Gu T, Ma B, Zheng G, Ke B, Zhang X (2014) The CRHR1 gene contributes to genetic susceptibility of aggressive behavior towards others in Chinese southwest Han population. *J Mol Neurosci* 52:481–486. doi:[10.1007/s12031-013-0160-z](https://doi.org/10.1007/s12031-013-0160-z)
46. Appel K, Schwahn C, Mahler J, Schulz A, Spitzer C, Fenske K (2011) Moderation of adult depression by a polymorphism in the FKBP5 gene and childhood physical abuse in the general population. *Neuropsychopharmacology* 36:1982–1991. doi:[10.1038/npp.2011.81](https://doi.org/10.1038/npp.2011.81)
47. Roy A, Gorodetsky E, Yuan Q, Goldman D, Enoch MA (2010) Interaction of FKBP5, a stress-related gene, with childhood trauma increases the risk for attempting suicide. *Neuropsychopharmacology* 35:1674–1863. doi:[10.1038/npp.2009.236](https://doi.org/10.1038/npp.2009.236)
48. Bevilacqua L, Carli V, Sarchiapone M, George DK, Goldman D, Roy A (2012) Interaction between FKBP5 and childhood trauma and risk of aggressive behavior. *Arch Gen Psychiatry* 69:62–70
49. de Kloet ER, Joëls M, Holsboer F (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6:463–475. doi:[10.1038/nrn1683](https://doi.org/10.1038/nrn1683)
50. Bale TL, Contarino A, Smith GW, Chan R, Gold LH, Sawchenko PE (2000) Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat Genet* 24:410–414
51. De Luca V, Tharmalingam S, Kennedy JL (2007) Association study between the corticotropin-releasing hormone receptor 2 gene and suicidality in bipolar disorder. *Eur Psychiatry* 22:282–287

**Estudio 3**

Martín-Blanco, A., Ferrer, M., Soler, J., Arranz, M.J., Vega, D., Bauzà, J., Calvo, N., Elices, M., Sanchez-Mora, C., García-Martinez, I., Salazar, J., Ribases, M., Carmona, C., Prat, M., & Pascual, J.C. (2015). An exploratory association study of the influence of noradrenergic genes and childhood trauma in Borderline Personality Disorder. *Psychiatry research*, 229, 589-592. doi: 10.1016/j.psychres.2015.07.046.







## Brief report

## An exploratory association study of the influence of noradrenergic genes and childhood trauma in Borderline Personality Disorder



Ana Martín-Blanco<sup>a,b</sup>, Marc Ferrer<sup>b,c</sup>, Joaquim Soler<sup>a,b</sup>, Maria Jesús Arranz<sup>a,d</sup>, Daniel Vega<sup>b,e,f</sup>, Joana Bauzà<sup>a,b</sup>, Natalia Calvo<sup>b,c</sup>, Matilde Elices<sup>a,b</sup>, Cristina Sanchez-Mora<sup>g</sup>, Iris García-Martínez<sup>g</sup>, Juliana Salazar<sup>h</sup>, Marta Ribases<sup>g</sup>, Cristina Carmona<sup>a,b</sup>, Mónica Prat<sup>b,c</sup>, Juan C. Pascual<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Psychiatry, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Institut d'Investigació Biomèdica-Sant Pau (IIB-Sant Pau), Av. Sant Antoni M<sup>o</sup> Claret 167, 08025 Barcelona Spain

<sup>b</sup> Psychiatry and Legal Medicine Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Department of Psychiatry, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Spain

<sup>d</sup> Fundació Docència i Recerca Mútua Terrassa, Terrassa, Spain

<sup>e</sup> Department of Psychiatry and Mental Health, Consorci Sanitari de l'Anoia, Spain

<sup>f</sup> Institut of Neurosciences, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

<sup>g</sup> Psychiatric Genetics Unit, Group of Psychiatry, Mental Health and Addictions, Vall d'Hebron Research Institut (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

<sup>h</sup> Department of Genetics, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, U705 CIBERER, Barcelona, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 23 February 2015

Received in revised form

14 July 2015

Accepted 15 July 2015

Available online 21 July 2015

## Keywords:

Borderline Personality Disorder

Childhood trauma

Noradrenergic system

## ABSTRACT

This study investigated the possible association of 40 polymorphisms within 4 noradrenergic genes with BPD risk and the modulating effect of childhood trauma on these associations in 481 BPD subjects and 442 controls. COMT rs5993882, DBH rs77905 and SLC6A2 rs1814270 showed associations with BPD, which were modulated by childhood trauma. However, none of these findings survived Bonferroni correction. Further investigation is needed to clarify the involvement of these genes in BPD pathogenesis.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Family and twin studies support an involvement of genetic factors in the aetiology of Borderline Personality Disorder (BPD) (Leichsenring et al., 2011), but molecular genetics studies, mainly focused on the serotonergic and dopaminergic systems, have provided inconsistent results (Calati et al., 2013; Amad et al., 2014). Although the noradrenergic system may be involved in symptoms like affective dysregulation, anxiety or impulsive aggression (Skodol et al., 2002), it has been scarcely investigated. Only the catechol-O-methyltransferase (COMT) Val158Met polymorphism has been studied, with contradictory results (Tadić et al., 2009; Nemoda et al., 2010; Lazzaretti et al., 2013).

The involvement of non-genetic factors such as childhood

trauma in BPD may account for the lack of congruent results (Amad et al., 2014). Noradrenergic genes may be good candidates to explore gene–environment interactions, since the noradrenergic system is one of the effectors of the stress response and has been related to childhood trauma (De Bellis et al., 1994; Liu et al., 2000). Furthermore, COMT's polymorphisms and stressful experiences have been associated with BPD (Wagner et al., 2010a; Wagner et al., 2010b).

The aim of this study was to investigate the contribution of variants within noradrenergic genes to BPD risk, and to explore the possible modulating effect of childhood trauma on this contribution.

### 2. Methods

A sample of 481 BPD subjects and 442 controls was recruited between 2002 and 2013 in BPD units from three Spanish hospitals. All participants were Caucasians of European descent from the

\* Corresponding author at: Department of Psychiatry, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Institut d'Investigació Biomèdica-Sant Pau (IIB-Sant Pau), Av. Sant Antoni M<sup>o</sup> Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. Fax: +34 93 553 78 42.

E-mail address: [jpascual@santpau.cat](mailto:jpascual@santpau.cat) (J.C. Pascual).

same geographic area.

Inclusion criteria for the BPD group were: BPD diagnosis according to the Spanish versions of the Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis II Disorders (SCID-II) (Gómez-Beneyto et al., 1994) and the Revised Diagnostic Interview for Borderlines (DIB-R) (Barrachina et al., 2004); no current episode of Axis I disorders; and no severe physical conditions. This group included mainly females (84%), with a mean age of 30 years (S.D.: 7.3), and a clinical profile of moderate severity according to DIB-R total score.

A subgroup of the BPD sample (N=154) filled in the self-administered Childhood Trauma Questionnaire – Short Form (CTQ-SF) (Bernstein et al., 2003). Trauma was classified as present if severity was at least moderate (i.e. cut-off scores of ≥ 8 for sexual abuse, ≥ 10 for physical abuse, ≥ 13 for emotional abuse, ≥ 10 for physical neglect, and ≥ 15 for emotional neglect). Nearly 75% of these subjects reported childhood trauma.

Controls were blood donors from the general population

(N=364), and included 82% of females with a mean age of 53.5 years (S.D.:18.6).

This sample has a total statistical power of ≥ 95% to detect genetic associations with a moderate genetic effect (O.R. ≥ 2) and 45–95% to detect associations with a small (w=0.1) or moderate (w=0.3) effect size, respectively, for childhood trauma comparisons (alpha=0.05).

This study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the collaborating hospitals and followed the principles in the Declaration of Helsinki. The participants gave informed consent to participate and received no retribution.

Forty polymorphisms (SNPs) in four noradrenergic genes were selected using the HapMap programme ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)) and the parameters  $r^2=0.80$  and  $MAF=0.05$  (*ADRB2*: rs1042717, rs1801704; *COMT*: rs4633, rs4680, rs740601, rs165774, rs174696, rs737865, rs933271, rs4646316, rs5993882, rs9332377; *DBH*: rs77905, rs129882, rs7851898, rs1541332, rs1611125, rs2007153,

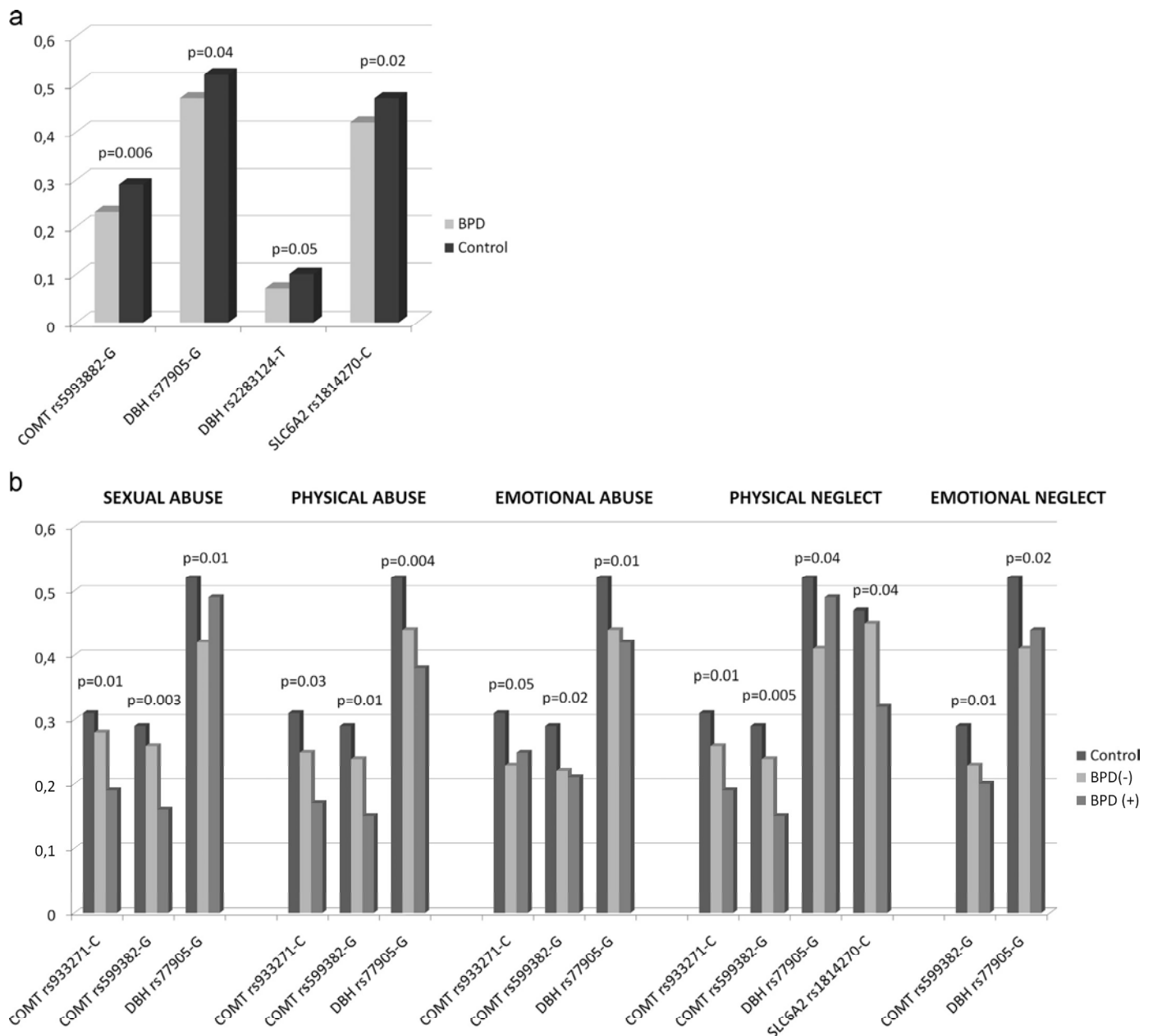


Fig. 1. (A) Significant single marker comparisons between subjects with BPD and controls. (B) Distribution of allelic frequencies in BPD patients with history of trauma (BPD+), patients without (BPD-), and controls. Only significant differences are represented.

rs2283124, rs2519143, rs2797851, rs2797853, rs3025382, rs3025388; *SLC6A2*: rs5568, rs5569, rs15534, rs36020, rs36021, rs36023, rs36024, rs40147, rs41154, rs47958, rs1800887, rs1814270, rs1861646, rs2242447, rs17307291, rs3785151). Genotyping was performed using real-time PCR technology and Taqman Custom open arrays. All but three of the investigated polymorphisms (*SLC6A2* rs40147, *DBH* rs7851898, and *ADRB2* rs1801704) were in Hardy–Weinberg equilibrium. Genotyping calling rates were > 95% across SNPs.

Chi-square and regression analyses were performed for the single marker analyses comparisons, and Bonferroni corrections were used to adjust for multiple analyses. Analyses were conducted using SPSS (IBM, v20.0) and Epilnfo v7.0.8.3. Phased (using the *E–M* algorithm) haplotype analyses were performed using PLINK version 1.07 (Purcell et al., 2007).

### 3. Results

Comparisons between patients and controls revealed associations between variants in the genes *COMT* (rs5993882-G,  $p=0.006$ ), *DBH* (rs77905-G,  $p=0.04$ ; rs2283124-T,  $p=0.05$ ) and *SLC6A2* (rs1814270-C,  $p=0.02$ ) and risk of BPD (Fig. 1). The minor frequency alleles had a protective effect in all significant associations (O.R. < 1). Haplotype combinations of *COMT* (TATGTACCGC) and *DBH* (GCGGTTTGGCAG) variants were also associated with BPD ( $p=0.03$  and  $p=0.05$ , respectively).

When dividing the sample into 3 groups—BPD patients with childhood traumas (BPD+), BPD patients without childhood traumas (BPD–) and controls—clearer associations were observed between *COMT* and *DBH* variants and risk of BPD (Fig. 1). The *COMT* rs5993882-G and rs933271-C rare variants were more frequent in controls than in BPD– and BPD+ ( $p < 0.05$  for all comparisons, except rs933271 for emotional neglect). *DBH* rs77905-G was less frequent in BPD+ than in BPD– and controls for each type of childhood trauma ( $p < 0.05$ ). *SLC6A2* rs1814270-C was less frequent in subjects with BPD with and without physical neglect ( $p=0.04$ ). Haplotype combinations of *COMT*, *SLC6A2* and *DBH* were also associated with BPD (data provided on request). None of these findings remained statistically significant after Bonferroni corrections (correction factor = 40 SNPs  $\times$  2 step analyses = 80).

### 4. Discussion

The results of the present study suggest the involvement of the noradrenergic system in the development of BPD, in combination with environmental factors.

Variants in the *COMT*, *DBH* and *SLC6A2* genes were associated with risk of BPD, although the statistical significance disappeared after stringent Bonferroni corrections. The conservative nature of Bonferroni corrections, the moderately large sample size and the biological plausibility of the findings suggest that they could be true. However, they should be considered with caution because of the absence of significance after Bonferroni corrections. These proteins have an important role. *COMT* is involved in catecholamines' degradation, *DBH* performs the transformation of dopamine into noradrenalin, and *SLC6A2* is a transporter responsible for the reuptake of extracellular neurotransmitters. Functional polymorphisms within these genes can lead to changes in noradrenalin brain levels, and to characteristic BPD symptoms such as affective dysregulation or suicidal behaviour (Skodol et al., 2002). None of the involved polymorphisms (*COMT* rs5993882-G, *DBH* rs77905-G and rs2283124-T, and *SLC6A2* rs1814270-C) have been previously investigated in BPD. A replication of these results is mandatory to confirm their implication in this aetiology. Our

results show that, except for the *DBH* rs2283124-T, the association of these polymorphisms with BPD may be modulated by childhood trauma. The modulation of the association between these genes and BPD by early stressful experiences may be due to the involvement of the noradrenergic system in the stress response and its vulnerability to early stress.

We did not replicate the association between the *COMT* Met/Met genotype and BPD previously reported (Tadić et al., 2009; Lazzaretti et al., 2013) but agree with the negative results of Némoda et al., (2010). Nevertheless, we found other variants (rs933271 and rs5993882) associated with risk, further contributing to the hypothesis of the involvement of *COMT* in BPD.

This study has several limitations. First, data about childhood maltreatment was not collected in all participants nor in controls, so we were only able to do an assessment of the modulator effect of childhood traumas rather than a direct study of their contribution to BPD. Furthermore, this data was retrospectively self-reported, and may be subject to bias. Second, none of the reported findings survived Bonferroni corrections and need to be replicated in independent studies. However, the most significant results would have survived a less restrictive correction considering all the SNPs within a gene as non-independent events.

In summary, our results provide new data suggesting a possible contribution of noradrenergic genetic variants to BPD pathogenesis under the modulating effect of childhood trauma. If they are replicated in independent samples, they will contribute their bit to the understanding of the complex biological basis underlying BPD.

### Conflict of Interest

None of the authors declare any biomedical financial interests or other potential conflicts of interest.

### Acknowledgement

This study was supported by Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM) and by a grant from Instituto de Salud Carlos III (PI10/00253).

### References

- Amad, A., Ramoz, N., Thomas, P., Jardri, R., Gorwood, P., 2014. Genetics of borderline personality disorder: systematic review and proposal of an integrative model. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 40, 6–19.
- Barrachina, J., Soler, J., Campins, M.J., Tejero, A., Pascual, J.C., Alvarez, E., Zanarini, M. C., Pérez Sola, V., 2004. Validation of a Spanish version of the diagnostic interview for borderlines revised (DIB-R). *Actas Esp. Psiquiatr.* 32, 293–298.
- Bernstein, D.P., Stein, J.A., Newcomb, M.D., Walker, E., Pogge, D., Ahluvalia, T., Stokes, J., Handelsman, L., Medrano, M., Desmond, D., Zule, W., 2003. Development and validation of a brief screening version of the Childhood Trauma Questionnaire. *Child Abuse Negl.* 27, 169–190.
- Calati, R., Gressier, F., Balestri, M., Serretti, A., 2013. Genetic modulation of borderline personality disorder: systematic review and meta-analysis. *J. Psychiatry. Res.* 47, 1275–1287.
- De Bellis, M.D., Lefter, L., Trickett, P.K., Putnam Jr., F.W., 1994. Urinary catecholamine excretion in sexually abused girls. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 33, 320–327.
- Gómez-Beneyto, M., Villar, M., Renovell, M., Pérez, F., Hernández, M., Leal, C., Cunqueirella, M., Slok, C., Asencio, A., 1994. The diagnosis of personality disorder with a modified version of the SCID-II in a Spanish clinical sample. *J. Personal. Disord.* 8, 104–110.
- Lazzaretti, M., Fabbro, D., Sala, M., Del Toso, K., de Vidovich, G., Marraffini, E., Morandotti, N., Gambini, F., Barale, F., Balestrieri, M., Damante, G., Caverzasi, E., Brambilla, P., 2013. Association between low-activity allele of catecholamine-O-methyl-transferase (*COMT*) and Borderline Personality Disorder in an Italian population. *Behav. Med.* 39, 25–28.
- Leichsenring, F., Leibing, E., Kruse, J., New, A.S., Leweke, F., 2011. Borderline personality disorder. *Lancet* 377, 74–84.
- Liu, D., Caldi, C., Sharma, S., Plotsky, P.M., Meaney, M.J., 2000. Influence of neonatal

- rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and nor-epinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *J. Neuroendocrinol.* 12, 5–12.
- Nemoda, Z., Lyons-Ruth, K., Szekely, A., Bertha, E., Faludi, G., Sasvari-Szekely, M., 2010. Association between dopaminergic polymorphisms and borderline personality traits among at-risk young adults and psychiatric inpatients. *Behav. Brain Funct.* 6, 4.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A.R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P.I., Daly, M.J., Sham, P.C., 2007. A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 559–575.
- Skodol, A.E., Siever, L.J., Livesley, W.J., Gunderson, J.G., Pfohl, B., Widiger, T.A., 2002. The borderline diagnosis II: biology, genetics, and clinical course. *Biol. Psychiatry* 51, 951–963.
- Tadić, A., Victor, A., Baškaya, O., von Cube, R., Hoch, J., Kouti, I., Anicker, N.J., Höppner, W., Lieb, K., Dahmen, N., 2009. Interaction between gene variants of the serotonin transporter promoter region (5-HTTLPR) and catechol O-methyltransferase (COMT) in borderline personality disorder. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* 150B, 487–495.
- Wagner, S., Baskaya, O., Anicker, N.J., Dahmen, N., Lieb, K., Tadić, A., 2010a. The catechol o-methyltransferase (COMT) val(158)met polymorphism modulates the association of serious life events (SLE) and impulsive aggression in female patients with borderline personality disorder (BPD). *Acta Psychiatr. Scand.* 122, 110–117.
- Wagner, S., Baskaya, O., Lieb, K., Dahmen, N., Tadić, A., 2010b. Lack of modulating effects of the COMT Val(158)Met polymorphism on the association of serious life events (SLE) and impulsivity in patients with borderline personality disorder. *J. Psychiatr. Res.* 44, 121–122.

**Estudio 4**

Martín-Blanco, A., Ferrer, M., Soler, J., Salazar, J., Vega, D., Andión, O., Sanchez-Mora, C., Arranz, M.J., Ribases, M., Feliu-Soler, A., Pérez, V., & Pascual, J.C. (2014). Association between methylation of the glucocorticoid receptor gene, childhood maltreatment, and clinical severity in borderline personality disorder. *Journal of psychiatric research*, 57, 34-40. doi: 10.1016/j.jpsychires.2014.06.011.





# Association between methylation of the glucocorticoid receptor gene, childhood maltreatment, and clinical severity in borderline personality disorder



Ana Martín-Blanco <sup>a, b</sup>, Marc Ferrer <sup>b, c</sup>, Joaquim Soler <sup>a, b</sup>, Juliana Salazar <sup>d</sup>, Daniel Vega <sup>b, e</sup>, Oscar Andión <sup>b, c</sup>, Cristina Sanchez-Mora <sup>f</sup>, Maria Jesús Arranz <sup>a</sup>, Marta Ribases <sup>f</sup>, Albert Feliu-Soler <sup>a, b</sup>, Víctor Pérez <sup>a, b</sup>, Juan Carlos Pascual <sup>a, b, \*</sup>

<sup>a</sup> Department of Psychiatry, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Institut d'Investigació Biomèdica – Sant Pau (IIB-Sant Pau), Spain

<sup>b</sup> Psychiatry and Legal Medicine Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Department of Psychiatry, Hospital Universitari de la Vall d'Hebron, Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Spain

<sup>d</sup> Department of Genetics, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

<sup>e</sup> Department of Psychiatry, Hospital de Igualada (Consorci Sanitari de l'Anoia), Spain

<sup>f</sup> Psychiatric Genetics Unit, Vall d'Hebron Research Institut, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 19 December 2013

Received in revised form

11 June 2014

Accepted 18 June 2014

### Keywords:

Borderline personality disorder

Genetics

Epigenetics

Methylation

Glucocorticoid receptor gene

Childhood trauma

## ABSTRACT

The hypothalamus-pituitary-adrenal axis (HPA) is essential in the regulation of stress responses. Increased methylation of the promoter region of the glucocorticoid receptor gene (*NR3C1*) has been described both in subjects with history of childhood trauma and in patients with Borderline Personality Disorder (BPD). However, no data on the possible association between a higher methylation of this gene and clinical severity is available. The aim of this study was to evaluate the association between *NR3C1* methylation status, the history of childhood trauma, and current clinical severity in subjects with BPD. A sample of 281 subjects with BPD (diagnosed by SCID-II and DIB-R semi-structured diagnostic interviews) was recruited. Clinical variables included previous hospitalizations, self-injurious behavior, and self-reported history of childhood trauma. DNA was extracted from peripheral blood. The results indicated a significant positive correlation between *NR3C1* methylation status and childhood maltreatment (specifically physical abuse). In addition, a positive correlation between methylation status and clinical severity (DIB-R total score and hospitalizations) was observed. These findings suggest that *NR3C1* methylation in subjects with BPD may be associated not only with childhood trauma but also with clinical severity, adding new evidence to the involvement of gene-environment interactions in this disorder.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The hypothalamus-pituitary-adrenal axis (HPA) (Nemeroff, 1999) is among the most important biological systems involved in the regulation of response to stress. Activation of this axis leads to the secretion of glucocorticoids from the adrenal cortex via the release of corticotrophin-releasing factor (CRF) and

adrenocorticotropin (ACTH). This system is regulated by the action of circulating glucocorticoids on glucocorticoid receptors in corticolimbic structures such as the hypothalamus or hippocampus. Early life stress has been associated with changes in HPA axis function in both preclinical and clinical studies (Heim and Nemeroff, 2001; Carpenter et al., 2007). This vulnerability of the HPA axis to early stress, together with its involvement in stress response, has prompted research into the role of this axis in Borderline Personality Disorder (BPD), especially because BPD is believed to be the result of an interaction between biologically-based temperamental vulnerabilities and stressful experiences in childhood (Linehan, 1993; Zanarini and Frankenburg, 1997; Beauchaine et al., 2009; Crowell et al., 2009). Most of the

\* Corresponding author. Department of Psychiatry, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental, CIBERSAM, Av. Sant Antoni M<sup>o</sup> Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 553 78 40; fax: +34 93 553 78 42.

E-mail address: [jpascual@santpau.cat](mailto:jpascual@santpau.cat) (J.C. Pascual).

published evidence indicates that BPD is characterized by HPA axis hyperactivity and reduced feedback sensitivity, although some studies have shown contradictory results (for a review, see [Wingenfeld et al., 2010](#)).

The influence of environmental factors on biological processes might occur through epigenetic mechanisms such as DNA methylation, which inhibits transcription and reduces gene expression. Methylation of HPA axis genes may disrupt the proper functioning of the HPA axis. Epigenetic research on this axis has focused primarily on the glucocorticoid receptor (GR) since the methylation pattern of its promoter region has been linked to early stressful events in rats ([Weaver et al., 2004](#)). In humans, methylation of the promoter region of the GR gene (named *NR3C1*) is reported to be higher in children exposed to maternal stress during pregnancy ([Oberlander et al., 2008](#); [Radtke et al., 2011](#); [Mulligan et al., 2012](#); [Hompe et al., 2013](#)), in victims of childhood trauma ([McGowan et al., 2009](#); [Labonte et al., 2012](#); [Tyrka et al., 2012](#); [Perroud et al., in press](#)), in subjects with BPD ([Dammann et al., 2011](#)) and in subjects with BPD and history of childhood trauma ([Perroud et al., 2011](#)). While most of the aforementioned studies obtained DNA from peripheral blood, two (both from the same research group) obtained DNA from brain tissue samples ([McGowan et al., 2009](#); [Labonte et al., 2012](#)). Those two studies found that suicide victims with a history of childhood trauma had higher levels of *NR3C1* methylation in the hippocampus compared to victims without such trauma and with control subjects.

To date, research on *NR3C1* methylation in BPD is scant. [Dammann et al. \(2011\)](#) compared 26 patients with BPD to 11 healthy controls to assess differences in the methylation pattern of *NR3C1* (and other neuropsychiatric genes). Those authors found that mean *NR3C1* methylation levels were significantly higher in BPD subjects than in the controls. [Perroud et al. \(2011\)](#) evaluated the association between childhood maltreatment and increased methylation of the *NR3C1* gene promoter in a sample of 101 subjects with BPD, 99 subjects with major depressive disorder (MDD), and 15 subjects with MDD and comorbid post-traumatic stress disorder (PTSD). Results of that study showed a positive correlation between sexual abuse, the severity of that abuse, the number of different types of maltreatment, and *NR3C1* methylation. In the BPD group, both sexual abuse and physical neglect, as well as the number of types of abuse and neglect, were associated with higher methylation levels. Moreover, BPD subjects without childhood maltreatment had higher *NR3C1* methylation levels than MDD subjects, suggesting that BPD could be, *per se*, linked to an increased methylation status.

In summary, data from these studies suggest that subjects with BPD who have suffered childhood trauma may have higher *NR3C1* methylation levels than those who have not. Moreover, taking into account that both specific kinds of childhood trauma ([Martín-Blanco et al., 2014](#)) and dysfunctions of the HPA axis have been linked to BPD severity ([Carrasco et al., 2007](#)), maybe the methylation status of *NR3C1* is also associated with the severity of this disorder. Therefore, the aim of the present study was to evaluate whether an association exists between *NR3C1* methylation status in a sample of subjects with BPD and the patients' history of childhood trauma and current clinical severity. Based on previous research, we hypothesized that both factors would be associated with higher methylation levels.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Participants

A sample of 281 subjects with BPD was recruited from 3 hospitals with specific BPD units (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau,

Hospital Universitari de la Vall d'Hebron and Hospital de Igualada). Inclusion criteria consisted of: (a) diagnosis of BPD according to DSM-IV criteria, assessed through two semi-structured diagnostic interviews: the Spanish validated versions of both the Structured Clinical Interview for Diagnostic and statistical manual of mental disorders-IV (DSM-IV) Axis II Disorders (SCID-II) ([Gómez-Beneyto et al., 1994](#)) and the Revised Diagnostic Interview for Borderlines (DIB-R) ([Barrachina et al., 2004](#)); (b) no current episode of any Axis I disorder according to DSM-IV criteria, including substance dependence; (c) no severe physical conditions such as organic brain syndrome, neurological disease or mental deficiency; and (d) being Caucasian of European descent. Experienced psychiatrists carried out a clinical interview to collect sociodemographic and clinical variables including age, sex, marital status, educational level, employment status, current pharmacological treatment, past episodes of axis I disorders, previous hospitalizations, and self-injurious behaviour (self-mutilation and suicide attempts). The participants also completed the Childhood Trauma Questionnaire (CTQ-SF) ([Bernstein et al., 2003](#)), a self-reported questionnaire designed to assess traumatic experiences in childhood.

This study was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the 3 collaborating hospitals and the study design followed the Declaration of Helsinki principles. All the participants gave informed consent to participate in the study and no compensation was given for participation.

### 2.2. Assessment instruments

- *Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis II Personality Disorders* (SCID-II) ([Gómez-Beneyto et al., 1994](#)): SCID-II is a semi-structured interview to assess personality disorders according to DSM-IV criteria. The instrument has shown an adequate inter-rater reliability and a fine discrimination among the Axis II personality disorders. We used the validated Spanish version.
- *Revised Diagnostic Interview for Borderlines* (DIB-R) ([Barrachina et al., 2004](#)): DIB-R is a semi-structured interview to diagnose BPD within the last two years. This instrument has shown good psychometric properties. We used the validated Spanish version.
- *Childhood Trauma Questionnaire - Short Form* (CTQ-SF) ([Bernstein et al., 2003](#)): The CTQ is a questionnaire designed to retrospectively assess childhood abuse and neglect. The short version (CTQ-SF) was developed by means of exploratory and confirmatory analyses of the 70 original CTQ items, and its validity in clinical and non-referred populations as a screening tool for maltreatment histories in childhood has been tested. The 28 items on the CTQ-SF are rated on a 5-point, Likert-type scale ranging from Never True to Very Often True. This questionnaire is divided into five clinical subscales: sexual, physical, and emotional abuse, as well as physical and emotional neglect.

### 2.3. Procedure

Blood samples were systematically collected from the subjects upon admittance to the unit. Genomic DNA was extracted from peripheral leukocytes by using the salting out procedure (Autopure, Qiagen) ([Miller et al., 1989](#)). We used the same protocols of blood collection, DNA extraction and storage for all the samples in this study in order to avoid variability when measuring methylation ([Wu et al., 2011](#)). As in previous studies ([Perroud et al., 2011](#)), DNA bisulphite treatment and PCR amplification were performed by means of EpiTech Bisulfite kit and the PyroMark PCR kit (Qiagen) respectively, following the manufacturer recommendations. Finally, pyrosequencing was performed in a PyroMark Q24 (Qiagen).



## 2.4. Structure of the NR3C1 gene

The glucocorticoid receptor gene (*NR3C1*) is located on chromosome 5q31-q32 (Hollenberg et al., 1985–86). It has a complex structure since it contains 8 translated exons (2–9), 9 untranslated alternative first exons (1A–1I) in the 5' region, and 3 splice variants with different functions (GR $\alpha$ , GR $\beta$  and GR-P) in the 3' region (Fig. 1). In the 5' region, the alternative exons 1A and 1I are located in the distal promoter region, whereas the rest are located in the proximal promoter region. These alternative first exons provide a differential tissue distribution (e.g. 1A is highly expressed in the immune system and 1F in hippocampus) (Turner et al., 2010).

Most of the *NR3C1* methylation studies conducted to date in the field of psychiatry have focused on exon 1F, which is the homolog of exon 1 $\gamma$  in rats (Turner and Muller, 2005). The exon 1 $\gamma$  promoter contains a binding site for the nerve growth factor-inducible protein A (NGFI-A), a protein reported to be highly expressed in the hippocampus of the offspring of caring mothers (McCormick et al., 2000). This maternal attitude has also been associated with an increased expression of the mRNAs containing this exon and with a reduced methylation pattern of this exon (McCormick et al., 2000; Weaver et al., 2004). For this reason, research in humans has focused on the homolog exon. Exon 1F also has a binding site for NGFI-A, and it is highly expressed in human hippocampus (Turner and Muller, 2005). Following the work of previous studies, we analyzed exon 1F of *NR3C1* (Oberlander et al., 2008; McGowan et al., 2009; Perroud et al., 2011), and specifically studied the methylation pattern of eight CpG sites following the protocol described by Perroud et al. (2011) (Fig. 2), since they also studied a BPD sample. These eight CpG islands correspond to CpG 6–13 described by Oberlander et al. (2008) but do not contain the binding site for NGFI-A, which is thought to be located 36 to 43 nucleotides upstream CpG1 of our study (Oberlander et al., 2008).

## 2.5. Statistical analysis

All analyses were performed with the SPSS 18.0 software package for Windows and all hypotheses were tested with a two-sided significance level of 0.05. The mean methylation percentage of the eight *NR3C1* CpG sites was used as the main variable to evaluate methylation status, although methylation of each individual CpG site was also considered.

Associations between demographic variables – including age, gender, marital status (stable partner yes/no), educational level (primary, secondary or superior studies), employment status (current employment yes/no), and current pharmacological treatment (yes/no) – and *NR3C1* methylation status were studied by means of Pearson correlation and ANOVA so as to identify potential covariates to be included in the regression model (see Supplementary data Table 1). The only significant association ( $p < 0.05$ ) was with employment status.

Linear regression (LR) models were carried out to evaluate the association between *NR3C1* methylation status and childhood trauma and clinical severity (i.e., DIB-R total score, self-injurious behavior and previous hospitalizations). A first LR model was created to evaluate the association between methylation and childhood trauma. In that model, the mean methylation percentage was included as dependent variable and all CTQ-SF subscales scores (i.e., emotional abuse, physical abuse, sexual abuse, emotional neglect, physical neglect, and total CTQ-SF score) and employment status as a confounding variable were included as independent variables. Each CpG site was separately analyzed with the same regression model. A second LR model was used to study the association between methylation and clinical severity. In this second model, DIB-R total score, self-injurious behavior, previous hospitalizations and employment status as a confounding variable were included as independent variables. Again, each CpG site was also separately analyzed. Finally, a third LR model combining both childhood maltreatment and clinical severity was conducted to study the association between average methylation as dependent variable and those significant types of childhood trauma and clinical severity variables as independent factors. Employment status was also included in the model as an independent variable. Given the exploratory nature of this study,  $p$  values under 0.05 were deemed significant and taken into consideration for the interpretation of linear regressions' results, and Bonferroni corrections for multiple comparisons were not applied.

## 3. Results

### 3.1. Demographics and clinical characteristics

Demographics, clinical characteristics and CTQ-SF scores are summarized in Table 1. The study sample consisted main of female

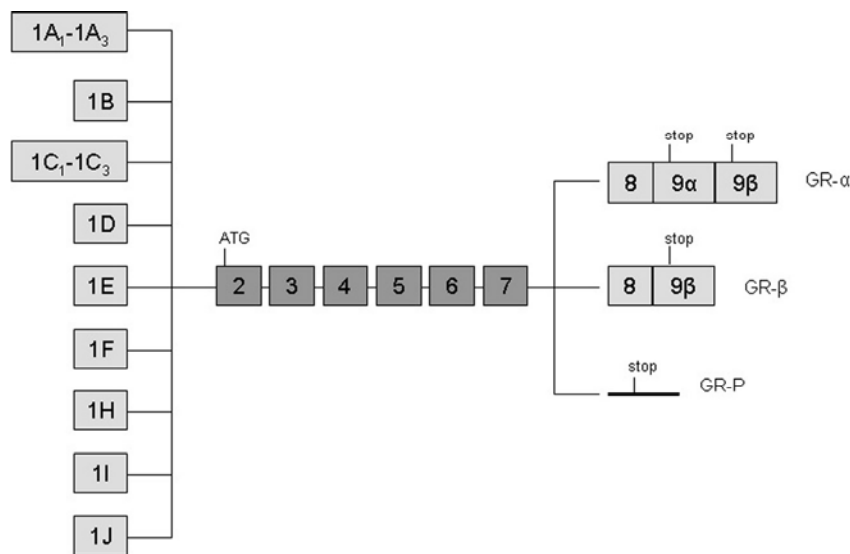
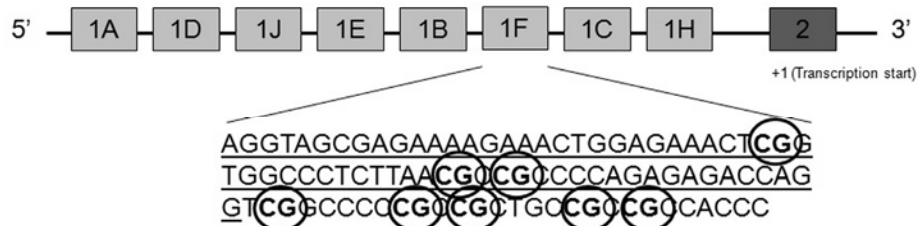


Fig. 1. Schematic representation of the GR gene (modified from Turner et al., 2010). Untranslated alternative first exons (1A–1I), translated exons (2–9) and splice variants (GR $\alpha$ , GR $\beta$  and GR-P) are shown.



**Fig. 2.** Schematic representation of the NR3C1 5' regulatory region (modified from Perroud et al., 2011). The full exon 1F region is underlined. CpGs analyzed are encircled and in order from CpG1 to CpG8.

patients (85%), with a mean age of 29 years. Only a third of the sample had a stable partner and/or job, and the more frequent educational level was secondary studies. Although the subjects had no current episodes of any axis I disorder, according to medical history past comorbidity was high with substance misuse (55.1%), anxiety disorders (46.7%), affective disorders (35.6%), and eating disorders (28.9%). Based on DIB-R scores, self-injurious behavior, and previous hospitalizations, the clinical profile of the sample was moderate to severe BPD. According to the CTQ-SF, 73% of the subjects reported some kind of childhood abuse or neglect.

Potential gender differences were analyzed for methylation status (average methylation), CTQ-SF subscales' scores and clinical severity. There were no significant differences between males and females for these variables (see Supplementary data Table 2, Figs. 1 and 2).

A figure showing the data on percentages of methylation (average and each individual CpG site) can be found in Supplementary data (Fig. 3).

### 3.2. Association between NR3C1 methylation and childhood trauma in BPD

Table 2 summarizes all LR analyses for NR3C1 methylation (overall mean and each CpG site). These analyses showed a

**Table 1**  
Demographic and clinical characteristics of BPD subjects.

	BPD sample (N = 281)
<b>Patient demographics</b>	
Age [years] mean (SD)	29.4 (7)
Sex [female] n (%)	239 (85.1)
Stable partner n (%)	88 (31.3)
Educational level n (%)	
Primary studies	91 (32.4)
Secondary studies	143 (50.9)
Superior studies	47 (16.7)
Current employment n (%)	82 (29.1)
<b>Clinical characteristics</b>	
DIB-R [total score] mean (SD)	7.3 (1.2)
Self-injury n (%)	145 (51.6)
Hospitalizations n (%)	120 (42.7)
Pharmacological treatment n (%)	247 (87.9)
<b>Childhood trauma-related variables</b>	
<b>CTQ-SF scores mean (SD)</b>	
Emotional abuse	14.18 (6.1)
Physical abuse	8.17 (4.5)
Sexual abuse	8.94 (5.5)
Emotional negligence	13.89 (5.3)
Physical negligence	7.94 (3.4)
CTQ-SF Abuse total	31.3 (13.1)
CTQ-SF Negligence total	21.8 (7.9)
CTQ-SF total	53.14 (19.4)
<b>Moderate-severe trauma n (%)</b>	
Emotional abuse	174 (61.9%)
Physical abuse	70 (24.9%)
Sexual abuse	119 (42.3%)
Emotional negligence	125 (44.5%)
Physical negligence	65 (21.1%)

Abbreviations: BPD = Borderline Personality Disorder; DIB-R = Diagnostic Interview for Borderlines – Revised; CTQ-SF = Childhood Trauma Questionnaire – Short Form.

significant positive correlation between NR3C1 methylation status and childhood maltreatment, but with a small effect size. The association was specifically with physical abuse ( $\beta = 0.06$ ), and a trend towards significance was seen for emotional neglect ( $p = 0.08$ ). Absence of employment was also associated with a higher NR3C1 methylation. When each CpG site was evaluated individually, only CpG 1, 2 and 3 showed a significant association with physical abuse, emotional neglect and absence of employment. Methylation at CpG6 was associated with emotional abuse and absence of employment. No association was found between NR3C1 methylation and general severity of childhood trauma (total CTQ-SF score).

### 3.3. Association between NR3C1 methylation and clinical severity in BPD

A summary of all LR analyses for NR3C1 methylation (overall mean and each CpG site) and clinical stressful factors is shown in Table 3. The LR analyses showed a significant positive correlation between overall NR3C1 methylation status and clinical stressful factors (DIB-R total score:  $\beta = 0.18$ , self-injury:  $\beta = 0.35$ , and previous hospitalizations:  $\beta = 0.36$ ). Absence of employment was also associated with a higher mean methylation ( $\beta = 0.43$ ). When each CpG site was evaluated individually, DIB-R scores were associated with CpG sites 2, 5, 7, and 8, self-injury with CpG sites 3, 4, 5, and 8, previous hospitalizations with CpG sites 2, 3, and 8, and absence of employment with CpG sites 2, 3, 6, 7, and 8.

### 3.4. Combined model of the association of childhood maltreatment and clinical severity with NR3C1 methylation in BPD

Table 4 shows the results of the LR model studying the association between NR3C1 methylation and those factors significantly associated with methylation in previous analyses. The combined model was statistically significant and explains 16% of the variance. According to this model, the variables significantly associated with an increased methylation were physical abuse, DIB-R total score and previous hospitalizations.

## 4. Discussion

The aim of this research was to evaluate the association between NR3C1 methylation status, childhood trauma, and clinical severity of BPD. The findings showed that higher methylation levels were associated with physical abuse, DIB-R total score and previous hospitalizations, although the effect sizes of these associations were small.

Regarding the relationship between NR3C1 methylation and childhood trauma, an association was found with physical abuse, and emotional neglect showed a trend towards significance. This finding is in line with previous research, such as that by Perroud et al. (2011), who also found an association between an increased methylation of this gene and childhood trauma in subjects with BPD, although in that study the association was with sexual abuse,

**Table 2**

Linear regression analyses for methylation status (overall mean and for each CpG site) according to CTQ-SF subscales and employment status.

Dependent variable	Regression model	Independent variables						
		Emotional abuse	Physical abuse	Sexual abuse	Emotional neglect	Physical neglect	Total CTQ-SF	Current employment
% <i>NR3C1</i> methylation								
Average	$R^2 = 0.10$ $p = 0.022$	<i>n.s.</i>	$\beta = 0.06$ $p = 0.009$	<i>n.s.</i>	$\beta = 0.04$ $p = 0.08$	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	$\beta = -0.48$ $p = 0.04$
CpG 1	$R^2 = 0.20$ $p = 0.001$	<i>n.s.</i>	$\beta = 0.07$ $p = 0.004$	<i>n.s.</i>	$\beta = 0.06$ $p = 0.002$	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	$\beta = -0.41$ $p = 0.03$
CpG 2	$R^2 = 0.24$ $p < 0.001$	<i>n.s.</i>	$\beta = 0.12$ $p < 0.001$	<i>n.s.</i>	$\beta = 0.10$ $p < 0.001$	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	$\beta = -0.81$ $p = 0.002$
CpG 3	$R^2 = 0.13$ $p = 0.005$	<i>n.s.</i>	$\beta = 0.07$ $p = 0.002$	<i>n.s.</i>	$\beta = 0.05$ $p = 0.015$	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	$\beta = -0.43$ $p = 0.039$
CpG 4	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
CpG 5	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
CpG 6	$R^2 = 0.10$ $p = 0.007$	$\beta = -0.05$ $p = 0.019$	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	$\beta = -0.71$ $p = 0.018$
CpG 7	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
CpG 8	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

Abbreviations: CTQ-SF : Childhood Trauma Questionnaire – Short Form; *n.s.*: non-significant;  $R^2$ : variance explained by the model;  $\beta$ : standardized Beta;  $p$ : *p*-value.

physical neglect, and repetition of abuses. Other authors directly investigated brain tissue (McGowan et al., 2009; Labonte et al., 2012) and have found this same association in subjects without BPD. In those studies, increased methylation was observed not only in exon 1F, but also in exons 1B, 1C and 1H, which are highly expressed in the hippocampus. This increase in methylation correlated with a reduced expression of *NR3C1* mRNA. All these data strongly support an association between childhood trauma and increased *NR3C1* methylation. This association is also congruent with the assumption of childhood trauma as the main environmental factor involved in BPD development, which is supported by retrospective and prospective studies (Zanarini, 2000; Widom et al., 2009). The discordance between our study and previous data in the type of childhood trauma that associates with higher *NR3C1* methylation, suggests that it is the magnitude of the impact, rather than the kind of trauma, which influences this gene methylation status in BPD. This hypothesis is supported by the observation that *NR3C1* methylation levels in BPD patients increase according to the number of different types of trauma (Perroud et al., 2011). However, this discordance may also be explained by differences between studies in sample's characteristics. In comparison with that from Perroud and colleagues' study, our sample had a higher percentage of male subjects, no current axis I disorders, and a lower percentage of subjects exposed to childhood trauma. Moreover, it is unknown if both samples also differ in factors which may have an influence on methylation state, such as socio-economic status, clinical severity, smoking habit or diet (McGowan et al., 2008; Terry et al., 2011; Zeilinger et al., 2013). When analyzing each CpG site individually, both types of childhood trauma (physical abuse and emotional neglect) were associated with increased methylation at CpG 1, 2 and 3, and emotional abuse was associated to increased methylation at CpG6. These results are not consistent with previous data on adults exposed to childhood trauma, although the scarce available information and the different sample characteristics may explain the inconsistencies. For instance, Tyrka et al. (2012) studied a group of healthy adults and found an association of childhood trauma with greater methylation at specific sites which have not been analyzed in our study, but did not find any association with the sites we have analyzed (CpG 6 to 13 from their study correspond to CpG 1 to 8 from ours). McGowan et al. (2009) also found significant associations between childhood abuse and higher methylation at 2 CpGs from the 38 analyzed, none of which correspond to our CpGs. Finally, Perroud et al. (2011) reported an association between the number of types of abuse and neglect and all CpGs (except CpG1) in the whole sample, which was composed of subjects with BPD, MDD and PTSD; however, no data

on associations with specific types of childhood trauma and specific CpG sites were reported in the BPD sample (Perroud et al., 2011). Therefore, more studies are needed to elucidate if some CpG are more related to childhood trauma than others or if it is the mean methylation percentage what really affects gene's transcription.

In terms of *NR3C1* methylation and clinical severity, our results showed a significant association with DIB-R total score, self-injurious behaviour and previous hospitalizations. Although the design of this study does not allow to draw conclusions on causality, this association may be explained in two opposite ways. The first explanation would be that not only early but also current stressful events may influence *NR3C1* methylation. Previous studies show contradictory results on this subject. While stressful life events in adolescence have been reported to be independently associated with *NR3C1* methylation (van der Knaap et al., 2014) other stressful situations like war stress (Mulligan et al., 2012) and intimate partner violence (Radtke et al., 2011) have not shown such association. Recent research supports the notion that methylation, rather than being an unalterable process, is subject to constant modulation by environmental factors such as pharmacological treatment, psychotherapy, diet, or smoking habit (Jaenisch and Bird, 2003; McGowan et al., 2008; Perroud et al., 2013b; Yehuda et al., 2013; Zeilinger et al., 2013). However, whether this plasticity is applicable to all genes is unknown, and some studies suggest otherwise. For instance, while methylation status of *BDNF* and *FKBP5* are modifiable with psychotherapy, no changes are seen in *NR3C1* (Perroud et al., 2013b; Yehuda et al., 2013). This agrees with the hypothesis that the vulnerability period for changes in *NR3C1* methylation is confined to early life, and these epigenetic marks may persist into adulthood and influence vulnerability for psychopathology through effects on HPA axis activity (e.g., McGowan et al., 2009; Meaney and Ferguson-Smith, 2010; Murgatroyd and Spengler, 2011; Tyrka et al., 2012; Yehuda et al., 2013). This leads to the second explanation to our findings, which is that those subjects with a higher *NR3C1* methylation may have an increased vulnerability to psychopathology and therefore to clinical severity. Although in the specific case of *NR3C1* most of the data published to date points to this last hypothesis, in our sample the CpG islands associated with clinical severity are different from those associated with childhood trauma, so maybe these are independent processes. Thus, the stability or variability of the epigenetic mark on *NR3C1* has yet to be clarified. With regard to the association between self-injurious behaviour and *NR3C1* methylation, the loss of significance when applying the combined model suggests that this factor is not independently associated with an increased methylation. This would be in accordance with previous studies, both in BPD and in

**Table 3**

Linear regression analyses for methylation status (overall mean and for each CpG site) according to clinical severity (DIB-R total score, self-injurious behaviour and previous hospitalizations) and employment status.

Dependent variable	Regression model	Independent variables			
		DIB-R total score	Self-injury	Previous hospitalization	Current employment
% NR3C1 methylation					
Average	$R^2 = 0.13$ $p < 0.001$	$\beta = 0.18$ $p = 0.003$	$\beta = 0.35$ $p = 0.022$	$\beta = 0.36$ $p = 0.022$	$\beta = -0.43$ $p = 0.008$
CpG 1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
CpG 2	$R^2 = 0.10$ $p = 0.002$	$\beta = 0.24$ $p = 0.004$	n.s.	$\beta = 0.46$ $p = 0.027$	$\beta = -0.48$ $p = 0.027$
CpG 3	$R^2 = 0.12$ $p = 0.001$	n.s.	$\beta = 0.33$ $p = 0.041$	$\beta = 0.52$ $p = 0.002$	$\beta = -0.36$ $p = 0.035$
CpG 4	$R^2 = 0.03$ $p = 0.033$	n.s.	$\beta = 0.54$ $p = 0.033$	n.s.	n.s.
CpG 5	$R^2 = 0.09$ $p = 0.010$	$\beta = 0.20$ $p = 0.025$	$\beta = 0.50$ $p = 0.025$	n.s.	n.s.
CpG 6	$R^2 = 0.09$ $p = 0.005$	n.s.	n.s.	n.s.	$\beta = -0.55$ $p = 0.009$
CpG 7	$R^2 = 0.10$ $p = 0.005$	$\beta = 0.30$ $p = 0.004$	n.s.	n.s.	$\beta = -0.58$ $p = 0.042$
CpG 8	$R^2 = 0.11$ $p = 0.003$	$\beta = 0.19$ $p = 0.011$	$\beta = 0.41$ $p = 0.034$	$\beta = 0.39$ $p = 0.044$	$\beta = -0.45$ $p = 0.024$

Abbreviations: DIB-R : Diagnostic Interview for Borderlines – Revised; n.s.: non-significant;  $R^2$ : variance explained by the model;  $\beta$ : standardized Beta;  $p$ :  $p$ -value.

the general population (McGowan et al., 2009; Perroud et al., 2011; Labonte et al., 2012), which have failed to find such an association. A similar explanation could be applied to the employment status, which also loses statistical significance in the combined model. In fact, subjects with a higher clinical severity are expected to have poorer occupational functioning.

Even though childhood trauma and clinical severity were associated with increased NR3C1 methylation in subjects with BPD, these factors only accounted for 16% of the variance. This suggests that other variables not evaluated in the present study (e.g., smoking habit or diet) may also influence NR3C1 methylation.

Despite the interesting results of this study, it is important to point out several limitations. First, the alpha level of  $p < 0.05$  were deemed significant given the exploratory nature of the study, however this could increase Type I errors. Second, methylation was evaluated in peripheral blood cells, and it is not clear if this actually reflects what happens in the brain. Several studies have reported a higher variability in methylation patterns across tissues or even across the different cell types that conform peripheral blood (Davies et al., 2012; Lam et al., 2012); however, concordant methylation alterations in brain and blood in neuropsychiatric diseases have also been shown (Masliyah et al., 2013). The inaccessibility of cerebral tissue has led to use peripheral blood in the study of epigenetics of psychiatric disorders, but results should be approached with caution until this issue is clarified. In spite of this, the concordance with studies in brain tissue strengthens our findings. Third, exon 1F of NR3C1 contains other CpG islands which have not been analyzed, such as those corresponding to NGFI-A binding site. Fourth, we have not assessed whether these disturbances in methylation patterns correlate with changes in levels of

GR's mRNA or protein. In fact, data from preclinical studies suggest that the regulation of GR expression requires changes in all the gene's promoters and not just in a single promoter (Freeman et al., 2004). Finally, there are other important epigenetic mechanisms involved in the regulation of GR expression that have not been considered, such as histone methylation/acetylation or microRNA (Turner et al., 2010). These limitations apply not only to the present study, but also to previous research on DNA methylation in BPD. All of these considerations, together with the fact that gene methylation is believed to be a dynamic process subject to influence by numerous environmental factors, present important difficulties in carrying out epigenetic studies in mental health.

In conclusion, our findings provide further evidence for the association between childhood trauma and NR3C1 methylation in subjects with BPD and open the way to study whether clinical severity is the cause or consequence of an increased methylation of this gene. Since there is increasing evidence for the involvement of gene-environment interactions in the development of this disorder, every small contribution to the study of epigenetics of this disorder may be important to disentangle its etiology. Nevertheless, further research is needed to confirm these findings and to assess the correlation between disturbances in methylation patterns and changes in HPA axis function.

#### Role of the funding source

This study was supported by Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM) and by a grant from Instituto de Salud Carlos III (PI10/00253 and PI11/00725).

#### Contributors

All authors contributed to the design of the study and criticized drafts of the report. AM, MF, VP, JCP were responsible for the conception and overall supervision of the trial. AF, OA and DV managed the project, data gathering and data entry. JS, CS and MR did genetic procedures. JCP, MJA and VP helped design the original trial protocol and established the methods. MJA, AF, JS and JCP did the data analyses. AM performed literature search. AM, MJA and JCP wrote the first draft of the report, and were responsible for subsequent collation of inputs and redrafting.

**Table 4**

Linear regression analysis for methylation status (average methylation) as dependent variable and those significant CTQ-SF subscales scores and clinical variables as independent variables.

	$R^2$	$p$	$B$	$p$
Regression model	0.16	0.004		
Independent variables				
Physical Abuse			0.05	0.032
DIB-R score			0.23	0.006
Previous hospitalization			0.41	0.05

Note:  $R^2$ : variance explained by the model;  $B$ : standardized Beta; DIB-R : Diagnostic Interview for Borderlines – Revised;  $p$ :  $p$ -value.

## Conflict of interest

All authors declare that they have no conflicts of interest.

## Acknowledgments

This study was supported by Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2014.06.011>.

## References

- Barrachina J, Soler J, Campins MJ, Tejero A, Pascual JC, Alvarez E, et al. Validation of a Spanish version of the diagnostic interview for borderlines revised (DIB-R). *Actas Esp Psiquiatr* 2004;32:293–8.
- Beauchaine TP, Klein DN, Crowell SE, Derbidge C, Gatzke-Kopp L. Multifinality in the development of personality disorders: a Biology  $\times$  Sex  $\times$  Environment interaction model of antisocial and borderline traits. *Dev Psychopathol* 2009;21:735–70.
- Bernstein DP, Stein JA, Newcomb MD, Walker E, Pogge D, Ahluvalia T, et al. Development and validation of a brief screening version of the Childhood Trauma Questionnaire. *Child Abuse Negl* 2003;27:169–90.
- Carpenter LL, Carvalho JP, Tyrka AR, Wier LM, Mello AF, Mello MF, et al. Decreased adrenocorticotropic hormone and cortisol responses to stress in healthy adults reporting significant childhood maltreatment. *Biol Psychiatry* 2007;62:1080–7.
- Carrasco JL, Díaz-Marsá M, Pastrana JI, Molina R, Brotons L, López-Ibor MI, et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis response in borderline personality disorder without post-traumatic features. *Br J Psychiatry* 2007;190:357–8.
- Crowell SE, Beauchaine TP, Linehan MM. A biosocial developmental model of borderline personality: elaborating and extending Linehan's theory. *Psychol Bull* 2009;135:495–510.
- Dammann G, Teschler S, Haag T, Altmüller F, Tuzek F, Dammann RH. Increased DNA methylation of neuropsychiatric genes occurs in borderline personality disorder. *Epigenetics* 2011;6:1454–62.
- Davies MN, Volta M, Pidsley R, Lunnon K, Dixit A, Lovestone S, et al. Functional annotation of the human brain methylome identifies tissue-specific epigenetic variation across brain and blood. *Genome Biol* 2012;13:R43.
- Freeman AI, Munn HL, Lyons V, Dammermann A, Seckl JR, Chapman KE. Glucocorticoid down-regulation of rat glucocorticoid receptor does not involve differential promoter regulation. *J Endocrinol* 2004;183:365–74.
- Gómez-Beneyto M, Villar M, Renovell M, Pérez F, Hernández M, Leal C, et al. The diagnosis of personality disorder with a modified version of the SCID-II in a Spanish clinical sample. *J Personal Disord* 1994;8:104–10.
- Heim C, Nemeroff CB. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry* 2001;50:200–4.
- Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, et al. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 1985–86;318:635–41.
- Hompes T, Izzi B, Gellens E, Morreels M, Fieuws S, Pexsters A, et al. Investigating the influence of maternal cortisol and emotional state during pregnancy on the DNA methylation status of the glucocorticoid receptor gene (NR3C1) promoter region in cord blood. *J Psychiatr Res* 2013;47:880–91.
- Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003;33(Suppl.):245–54.
- Labonte B, Yerko V, Gross J, Mechawar N, Meaney MJ, Szyf M, et al. Differential glucocorticoid receptor exon 1(B), 1(C), and 1(H) expression and methylation in suicide completers with a history of childhood abuse. *Biol Psychiatry* 2012;72:41–8.
- Lam LL, Emberly E, Fraser HB, Neumann SM, Chen E, Miller GE, et al. Factors underlying variable DNA methylation in a human community cohort. *PNAS* 2012;109(Suppl. 2):17253–60.
- Linehan MM. Cognitive-behavioral treatment for borderline personality disorder: the dialectics of effective treatment. New York: The Guilford Press; 1993.
- Martín-Blanco A, Soler J, Villalta L, Feliu-Soler A, Elices M, Pérez V, et al. Exploring the interaction between childhood maltreatment and temperamental traits on the severity of borderline personality disorder. *Compr Psychiatry* 2014;55:311–8.
- Masliah E, Dumaop W, Galasko D, Desplats P. Distinctive patterns of DNA methylation associated with Parkinson disease: identification of concordant epigenetic changes in brain and peripheral blood leukocytes. *Epigenetics* 2013;8:1030–8.
- McCormick JA, Lyons V, Jacobson MD, Noble J, Diorio J, Nyirenda M, et al. 5'-heterogeneity of glucocorticoid receptor messenger RNA is tissue specific: differential regulation of variant transcripts by early-life events. *Mol Endocrinol* 2000;14:506–17.
- McGowan PO, Meaney MJ, Szyf M. Diet and the epigenetic (re)programming of phenotypic differences in behavior. *Brain Res* 2008;1237:12–24.
- McGowan PO, Sasaki A, D'Alessio AC, Dymov S, Labonte B, Szyf M, et al. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat Neurosci* 2009;12:342–8.
- Meaney MJ, Ferguson-Smith AC. Epigenetic regulation of the neural transcriptome: the meaning of the marks. *Nat Neurosci* 2010;13:1313–8.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1989;16:1215.
- Mulligan CJ, D'Errico NC, Stees J, Hughes DA. Methylation changes at NR3C1 in newborns associate with maternal prenatal stress exposure and newborn birth weight. *Epigenetics* 2012;7:853–7.
- Murgatroyd C, Spengler D. Epigenetics of early child development. *Front Psychiatry* 2011;2:16.
- Nemeroff CB. The preeminent role of early untoward experience on vulnerability to major psychiatric disorders: the nature-nurture controversy revisited and soon to be resolved. *Mol Psychiatry* 1999;4:106–8.
- Oberlander TF, Weinberg J, Papsdorf M, Grunau R, Misri S, Devlin AM. Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses. *Epigenetics* 2008;3:97–106.
- Perroud N, Paoloni-Giacobino A, Prada P, Olié E, Salzmann A, Nicastro R, et al. Increased methylation of glucocorticoid receptor gene (NR3C1) in adults with a history of childhood maltreatment: a link with the severity and type of trauma. *Transl Psychiatry* 2011;1:e59.
- Perroud N, Dayer A, Piguet C, Nallet A, Favre S, Malafosse A, et al. Childhood maltreatment and methylation of the glucocorticoid receptor gene NR3C1 in bipolar disorder. *Br J Psychiatry* 2013 [in press].
- Perroud N, Salzmann A, Prada P, Nicastro R, Hoeppli ME, Furrer S, et al. Response to psychotherapy in borderline personality disorder and methylation status of the BDNF gene. *Transl Psychiatry* 2013b;3:e207.
- Radtke KM, Ruf M, Gunter HM, Dohrmann K, Schauer M, Meyer A, et al. Trans-generational impact of intimate partner violence on methylation in the promoter of the glucocorticoid receptor. *Transl Psychiatry* 2011;1:e21.
- Terry MB, Delgado-Cruzata L, Vin-Raviv N, Wu HC, Santella RM. DNA methylation in white blood cells: association with risk factors in epidemiologic studies. *Epigenetics* 2011;6:828–37.
- Turner JD, Muller CP. Structure of the glucocorticoid receptor (NR3C1) gene 5' untranslated region: identification, and tissue distribution of multiple new human exon 1. *J Mol Endocrinol* 2005;35:283–92.
- Turner JD, Alt SR, Cao L, Vernocchi S, Trifonova S, Battello N, et al. Transcriptional control of the glucocorticoid receptor: CpG islands, epigenetics and more. *Biochem Pharmacol* 2010;80:1860–8.
- Tyrka AR, Price LH, Marsit C, Walters OC, Carpenter LL. Childhood adversity and epigenetic modulation of the leukocyte glucocorticoid receptor: preliminary findings in healthy adults. *PLoS One* 2012;7:e30148.
- van der Knaap LJ, Riese H, Hudziak JJ, Verbiest MM, Verhulst FC, Oldehinkel AJ, et al. Glucocorticoid receptor gene (NR3C1) methylation following stressful events between birth and adolescence. The TRAILS study. *Transl Psychiatry* 2014;4:e381.
- Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, et al. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* 2004;7:847–54.
- Widom CS, Czaja SJ, Paris J. A prospective investigation of borderline personality disorder in abused and neglected children followed up into adulthood. *J Personal Disord* 2009;23:433–46.
- Wingenfeld K, Spitzer C, Rullkötter N, Löwe B. Borderline personality disorder: hypothalamus pituitary adrenal axis and findings from neuroimaging studies. *Psychoneuroendocrinology* 2010;35:154–70.
- Wu HC, Delgado-Cruzata L, Flom JD, Kappil M, Ferris JS, Liao Y, et al. Global methylation profiles in DNA from different blood cell types. *Epigenetics* 2011;6:76–85.
- Yehuda R, Daskalakis NP, Desarnaud F, Makotkine I, Lehrner AL, Koch E, et al. Epigenetic biomarkers as predictors and correlates of symptom improvement following psychotherapy in combat veterans with PTSD. *Front Psychiatry* 2013;4:118.
- Zanarini MC. Childhood experiences associated with the development of borderline personality disorder. *Psychiatr Clin North Am* 2000;23:89–101.
- Zanarini MC, Frankenburg FR. Pathways to the development of borderline personality disorder. *J Personal Disord* 1997;11:93–104.
- Zeilinger S, Kühnel B, Klopp N, Baurecht H, Kleinschmidt A, Gieger C, et al. Tobacco smoking leads to extensive genome-wide changes in DNA methylation. *PLoS One* 2013;8:e63812.



**Supplementary Table 1.** Gender differences on methylation status, childhood maltreatment, and clinical severity.

	Average methylation	
	mean (SD)	p
<b>Gender</b>		0.49
<b>Male</b>	3.55	
<b>Female</b>	3.66	
<b>Stable partner</b>		0.36
<b>No</b>	3.50	
<b>Yes</b>	3.63	
<b>Educational level</b>		0.59
<b>Primary studies</b>	3.75 (0.91)	
<b>Secondary studies</b>	3.56 (0.95)	
<b>Superior studies</b>	3.55 (0.9)	
<b>Current employment</b>		0.015*
<b>No</b>	3.75 (0.84)	
<b>Yes</b>	3.37 (1.02)	
<b>Pharmacological treatment</b>		0.6
<b>No</b>	3.65 (0.74)	
<b>Yes</b>	3.54 (0.98)	

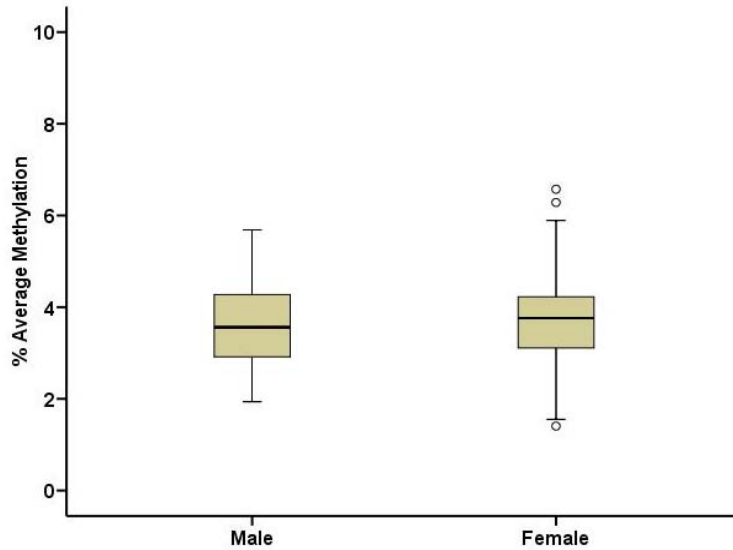
Abbreviations: p= p-value; \*: statistically significant.

**Supplementary Table 2.** Gender differences on methylation status, childhood maltreatment, and clinical severity.

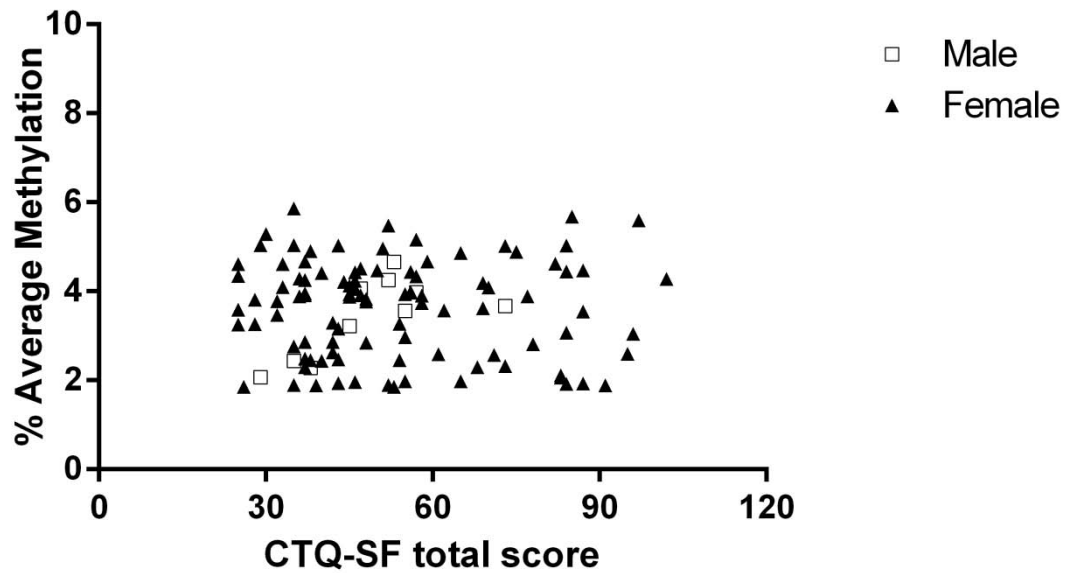
Variables	Males (n = 42)	Females (n = 239)	p
Average Methylation mean (SD)	3.55 (0.92)	3.66 (0.93)	<i>n.s</i>
CTQ-SF total score	54.13 (16.0)	53.34 (20.03)	<i>n.s</i>
CTQ-SF Emotional Abuse	13.74 (5.15)	14.31 (6.21)	<i>n.s</i>
CTQ-SF Physical Abuse	9.55 (5.2)	8.42 (4.75)	<i>n.s</i>
CTQ-SF Sexual Abuse	7.13 (3.73)	8.65 (5.13)	<i>n.s</i>
CTQ-SF Emotional Neglect	14.97 (5.32)	13.87 (5.58)	<i>n.s</i>
CTQ-SF Physical Neglect	8.74 (3.22)	8.15 (3.99)	<i>n.s</i>
DIB-R total score	7.27 (1.23)	7.46 (1.26)	<i>n.s</i>
Self-injury (%)	52.6%	55.4%	<i>n.s</i>
Previous hospitalizations (%)	42.4%	43.8%	<i>n.s</i>

Abbreviations: DIB-R = Diagnostic Interview for Borderlines – Revised; CTQ-SF = Childhood Trauma Questionnaire – Short Form; *n.s.*: non-significant; p: p-value.

**Supplementary Figure 1.** Box-plot of the methylation status (average of methylation) by gender.



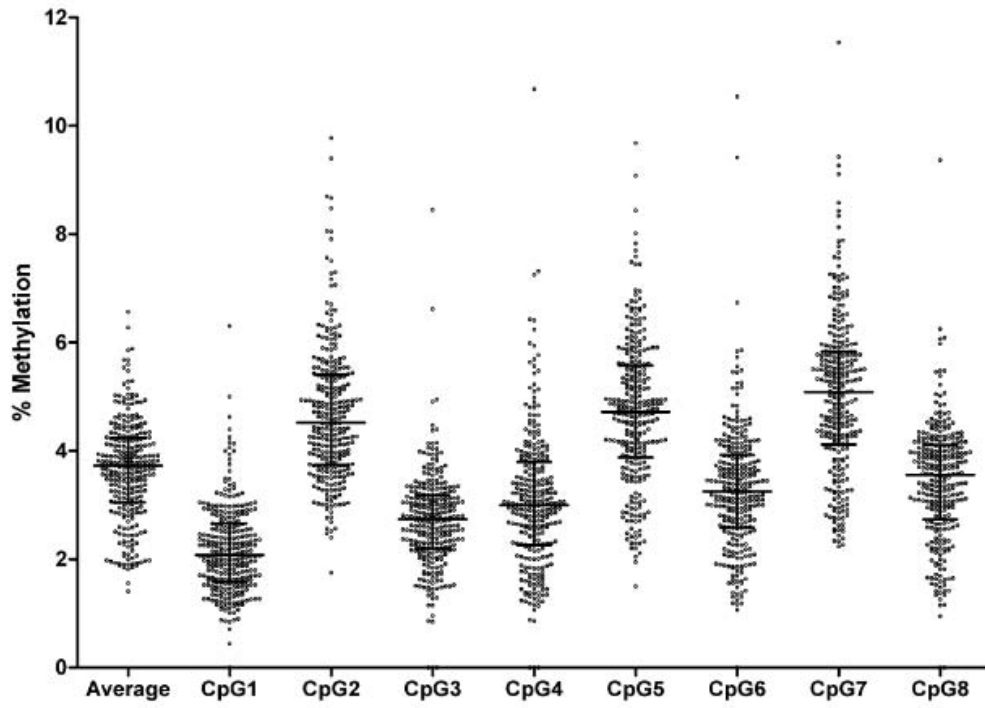
**Supplementary Figure 2.** Scatter plot shows the relation between childhood maltreatment (CTQ-SF total score) and *NR3C1* methylation status (average methylation) by gender.



Abbreviation: CTQ-SF = Childhood Trauma Questionnaire – Short Form.



**Supplementary Figure 3.** Methylation analysis of *NR3C1* gene. Dot plots of average methylation level and percentages of methylation of each CpG site in our sample are shown. Median and interquartile range are also represented.





---

# **Discusión general**

---



En esta tesis se ha estudiado la implicación de factores genéticos y ambientales en el TLP. Basándonos en la hipótesis de que alteraciones en genes de los sistemas de respuesta al estrés del organismo conferirían una vulnerabilidad para desarrollar la enfermedad y que dicha vulnerabilidad se vería modulada por los antecedentes de traumas en la infancia, se planteó como objetivo principal estudiar la asociación entre genes del eje HHA y del sistema noradrenérgico con el TLP y la posible modulación de dichas asociaciones por la presencia de traumas infantiles. Este objetivo se abordó en dos estudios (Estudio 2 y Estudio 3). Previamente a la realización de estos dos estudios, y a modo exploratorio, nos pareció interesante valorar si la interacción entre factores biológicos de base genética y traumas en la infancia se asociaba también con aspectos clínicos del trastorno, en concreto con la gravedad (Estudio 1). Una vez desarrollados estos objetivos, y motivados por los recientes avances científicos en el campo de la genética en el TLP, evaluamos si el grado de metilación de un gen del eje HHA, el del GR, se asociaba con los antecedentes de traumas en la infancia y/o con la gravedad del trastorno (Estudio 4). Así, en la tesis se ha abordado desde diversas perspectivas la relación entre factores genéticos y ambientales en el TLP. A continuación se discutirán los hallazgos obtenidos más relevantes.

En el primer estudio quisimos hacer una aproximación a la teoría de interacción entre factores biológicos y ambientales. Siguiendo la teoría biopsicosocial del TLP (Beauchaine et al., 2009; Crowell et al., 2009; Zanarini & Frankenburg, 1997), según la cual este trastorno resultaría de la interacción entre vulnerabilidades temperamentales de base biológica y experiencias adversas en la infancia, hipotetizamos que esta interacción se asociaría también con la gravedad del trastorno. Abordamos pues uno de los objetivos secundarios del estudio, que era evaluar si existe asociación entre los antecedentes de traumas en la infancia y la gravedad del trastorno en sujetos con TLP, y si dicha asociación está mediada por los rasgos temperamentales. Nuestros resultados confirmaron dicha hipótesis, pues mostraron que la interacción entre el rasgo temperamental de neuroticismo-ansiedad y los antecedentes de abuso emocional en la infancia se asociaba con la gravedad del TLP, de tal forma que el abuso emocional se relacionaba con una mayor gravedad principalmente en aquellos sujetos con un alto neuroticismo. Así pues, el rasgo temperamental de neuroticismo actuaría como un modulador de la asociación entre historia de abuso emocional y gravedad del trastorno. También vimos que este rasgo temperamental se asociaba con la gravedad del TLP independientemente de los antecedentes traumáticos. Todo ello sugiere que el neuroticismo sería un factor determinante en la gravedad del TLP, tanto de forma directa como a través de

su interacción con el abuso emocional. Este hallazgo concuerda con varios estudios que han mostrado que las personas con un elevado neuroticismo que se ven expuestas a sucesos vitales estresantes responden con emociones negativas más frecuente e intensamente que los sujetos poco neuróticos (Lahey, 2009) y con que un bajo neuroticismo sea un factor de buen pronóstico del TLP a largo plazo (Zanarini et al., 2006a). Además, el neuroticismo se ha relacionado con la gravedad no sólo en el TLP (Laporte et al., 2011), sino también en otros trastornos psiquiátricos como la depresión (Brown, 2007), el trastorno disfórico premenstrual (Gingnell, Comasco, Orelund, Fredrikson, & Sundström-Poromaa, 2010) o la dependencia enólica (Schwandt, Heilig, Hommer, George, & Ramchandani, 2013). Otro rasgo temperamental que en nuestro estudio se asoció individualmente con la gravedad del TLP fue la agresividad-hostilidad; a diferencia del neuroticismo, no obstante, no interaccionaba con el abuso emocional. Según el cuestionario que empleamos para evaluar los rasgos temperamentales, el ZKPQ (*Zuckerman–Kuhlman Personality Questionnaire*; Zuckerman, 2002), la agresividad-hostilidad se define como “agresividad verbal, conducta grosera, desconsiderada o antisocial, venganza, rencor, mal genio o impaciencia para con otros”, de forma que este rasgo podría estar relacionado con la agresividad impulsiva típica de los pacientes con TLP y quizá por ello también con la gravedad del trastorno. Estos tres factores (agresividad-hostilidad, neuroticismo-ansiedad y abuso emocional) explicaban el 30% de la variancia en el modelo de regresión, lo que indica que habría otros factores relacionados con la gravedad del TLP que no se evaluaron en nuestro estudio. La literatura al respecto es escasa. Estudios posteriores a la publicación de este primer estudio sugieren que también podrían relacionarse con la gravedad de los síntomas del TLP factores parentales, como un exceso de sobreprotección percibida (Schuppert, Albers, Minderaa, Emmelkamp, & Nauta, 2015), o factores biológicos, como alteraciones del volumen de regiones amigdalares (Schienle, Leutgeb, & Wabnegger, 2015) o mayores niveles de MAO-A en el córtex prefrontal y el cíngulo anterior (Kolla et al., 2014).

El resto de rasgos temperamentales evaluados (sociabilidad, actividad e impulsividad-búsqueda de sensaciones) no se relacionaron con la gravedad. Tampoco el resto de traumas infantiles (abuso sexual y físico, y negligencia física y emocional). Aunque a primera vista sorprende, puesto que el abuso sexual, por ejemplo, sí se había asociado con la gravedad del TLP en estudios previos (Lieb, Zanarini, Schmahl, Linehan, & Bohus, 2004), en los últimos años algunos autores están comenzando a considerar que el principal tipo de maltrato en el TLP sería el abuso emocional (Hernández et al., 2012; Kuo et al., 2015). Como en nuestro estudio,

en que vemos que la relación entre este tipo de abuso y la gravedad del TLP estaría modulada por el rasgo temperamental de neuroticismo, otros autores han descrito diferentes moduladores de la relación, como las dificultades en la regulación emocional (Kuo et al., 2015) o la sensibilidad al rechazo (Chesin, Fertuck, Goodman, Lichenstein, & Stanley, 2015).

En resumen, nuestros datos apoyarían la implicación de factores ambientales en conjunto con rasgos temperamentales en la gravedad sintomática del TLP. Estos rasgos temperamentales se supone que tienen una base biológica determinada genéticamente (Zuckerman, 1991). De hecho, estudios con gemelos han descrito una heredabilidad de entre el 40 y el 60% para los modelos temperamentales psicobiológicos (Cloninger, Przybeck, Svrakic, & Wetzel, 1994; Jang, Livesley, & Vernon, 1996; Riemann, Angleitner, & Strelau, 2006), como el modelo de cinco factores alternativo de Zuckerman (AFFM, del inglés *Alternative Five Factor Model*) (Zuckerman, 1991) que empleamos en nuestro estudio. En base a esto, podríamos concluir que nuestros datos apoyarían al menos en parte la implicación de la interacción entre factores ambientales (traumas en la infancia) y genéticos (rasgos temperamentales) en la gravedad del TLP.

En los siguientes dos estudios abordamos el objetivo principal de la tesis, que era identificar asociaciones entre polimorfismos de genes de los sistemas de respuesta al estrés y el TLP, y evaluar la posible modulación de dichas asociaciones por los antecedentes de traumas en la infancia. En total exploramos 87 variantes comunes en 14 genes, 10 del eje HHA (Estudio 2) y 4 del sistema noradrenérgico (Estudio 3). Nuestra hipótesis era que encontraríamos asociaciones entre algunos de estos polimorfismos y el TLP, las cuales estarían moduladas por los antecedentes de sucesos traumáticos en la infancia. Como discutiremos más ampliamente a continuación, nuestros resultados apoyan esta hipótesis aunque de una forma preliminar, puesto que las asociaciones que encontramos no sobrevivieron a la corrección por múltiples comparaciones de Bonferroni. Cabe decir que dicha corrección ha recibido críticas por ser demasiado restrictiva (Perneger, 1998) y asume que todos los polimorfismos investigados son sucesos independientes, cuando por el fenómeno de desequilibrio de ligamiento se sabe que podría no ser así. Al comparar las frecuencias de las variantes exploradas entre sujetos con TLP y controles, en el caso del eje HHA vimos asociaciones con riesgo de TLP en el gen *FKBP5* (rs4713902 y rs9470079), y con respecto al sistema noradrenérgico en los genes *COMT* (rs5993882), *DBH* (rs77905 y rs2283124) y *SLC6A2* (rs1814270). Salvo para el polimorfismo *FKBP5* rs9470079, en el resto de casos la variante de menor frecuencia era significativamente

más frecuente en los controles que en los casos, con lo que tendría un efecto protector. Como ya se ha comentado en la introducción, el encontrar una asociación entre un marcador y una enfermedad es sugestivo de que, o bien dicho polimorfismo, o bien otro polimorfismo cercano en el mismo gen, se asocian con la enfermedad. Por ello, podemos decir que nuestros resultados sugieren la implicación de estos genes en el TLP. El análisis por haplotipos también mostraba asociación de polimorfismos de estos genes (a excepción del gen *SLC6A2*), así como del gen *CRHR1*, con el TLP. En la mayoría de los casos, como estos genes no habían sido estudiados con anterioridad en el TLP, no podemos comparar nuestros resultados con hallazgos previos. El único polimorfismo que sí se había estudiado era el *COMT* rs4680, con resultados contradictorios, pues en dos estudios se había descrito una asociación entre la variante Met/Met y el TLP (Tadic et al., 2009b; Lazzaretti et al., 2013) y en otro no se vio tal asociación (Nemoda et al., 2010). Nuestros resultados tampoco replicaron este hallazgo, pero sí vimos otras variantes (rs933271 y rs5993882) relacionadas con el TLP, apoyando la implicación del gen *COMT* en el trastorno.

Con respecto al resto de genes que mostraron una asociación con el TLP (*FKBP5*, *CRHR1*, *DBH* y *SLC6A2*) su implicación en esta patología es plausible, tanto por la función que desempeñan las proteínas codificadas por dichos genes como porque se han descrito asociaciones entre variantes de estos genes y otros trastornos psiquiátricos que comparten síntomas con el TLP. Veamos detalladamente uno a uno. El gen *FKBP5* codifica para la proteína FK506, implicada en la regulación de los receptores de glucocorticoides mediante la reducción de la afinidad de dicho receptor por su ligando y, en consecuencia, la disminución de la expresión de genes dependientes de este receptor (Wochnik et al., 2005). Se han relacionado polimorfismos en este gen con alteraciones de la función del eje HHA, tanto en la población general (Touma et al., 2011) como en pacientes con TEPT (Mehta et al., 2011). El receptor de CRH tipo I se encarga de mediar la acción estimuladora del CRF sobre la secreción de ACTH, siendo uno de los principales componentes del eje HHA en la respuesta inicial al estrés; por tanto, un déficit de *CRHR1* ocasionaría una respuesta alterada al estrés (Smith et al., 1998; Timpl et al., 1998). Variantes en este gen se han asociado con síntomas depresivos (Engineer et al., 2013; Liu et al., 2006) y conductas auto o heteroagresivas (Chen et al., 2014; Wasserman, Sokolowski, Rozanov, & Wasserman, 2008). La *DBH* es la enzima encargada de la transformación de dopamina en noradrenalina, y se han descrito asociaciones entre polimorfismos de este gen y depresión (Togsverd et al., 2008; Zhou et al., 2015), dependencia de alcohol (Preuss et al., 2013) y sensibilidad interpersonal y paranoia en pacientes afectivos (Wood, Joyce, Miller,



Mulder, & Kennedy, 2002). Por último, el gen *SCL6A2* codifica para el transportador de noradrenalina que se encarga de la recaptación de neurotransmisor en el terminal presináptico, habiéndose descrito su implicación en el trastorno de pánico (Buttenschøn et al., 2011), dependencia de alcohol (Clarke et al., 2012), TDAH (Kim et al., 2006), depresión (Haenisch et al., 2009) y riesgo de suicidio en pacientes deprimidos (Kim et al., 2014).

Tanto en los genes del eje HHA como en los del sistema noradrenérgico, vimos que los traumas infantiles modulaban su asociación con el TLP, puesto que algunos polimorfismos se distribuían de forma diferente en los tres grupos comparados (TLP con trauma, TLP sin trauma y grupo control). En el caso de los genes del eje HHA, los polimorfismos no coincidían con los que habían mostrado asociaciones significativas al no tener en cuenta los traumas en la infancia, lo que podría reflejar que hay variantes cuya asociación con la enfermedad se ve modulada por los tipos de traumas infantiles evaluados y variantes que no (lo cual no significa que no esté modulada por otros tipos de sucesos traumáticos o ambientales en general). Es interesante destacar que, según nuestros resultados, cada tipo de trauma modularía unos polimorfismos diferentes. En el eje HHA sólo actúan como moduladores el abuso sexual, el abuso físico y la negligencia emocional. En el sistema noradrenérgico, en cambio, tienen un papel modulador los cinco tipos de abuso/negligencia, y hay dos variantes que se ven afectadas por todos los tipos de abuso, que son la *COMT* rs5993882 y *DBH* rs77905, variantes que también se distribuyen de forma diferente entre casos y controles al no tener en cuenta los traumas. El porqué de esta modulación diferencial es una cuestión a día de hoy sin resolver.

Una vez confirmado que los traumas en la infancia podrían interactuar con varios genes de los sistemas de respuesta al estrés favoreciendo así el desarrollo de TLP, nos planteamos como objetivo averiguar si también podían influir sobre el patrón de metilación de alguno de estos genes, concretamente del gen *GR* (Estudio 4). La elección de este gen y no otro fue debida a la vasta literatura existente acerca de su patrón diferencial de metilación en función de los sucesos adversos en la infancia (detallada en la Introducción). También quisimos investigar si indicadores de gravedad del TLP (puntuación de la DIB-R, autolesiones y hospitalizaciones) se asociaban con el grado de metilación de este gen. Nuestra hipótesis, que era que tanto los antecedentes de traumas en la infancia como los indicadores de gravedad se asociarían con una mayor metilación del *GR*, se vio confirmada por los resultados del estudio, pues observamos dicha asociación tanto en el caso del abuso físico infantil como de la puntuación de la DIB-R y las hospitalizaciones previas. Estos tres factores explicaban un 16% de la

variancia, sugiriendo que en la metilación de este gen influirían otros factores no evaluados en nuestro estudio. Debido al diseño del estudio, no es posible determinar relaciones causa-efecto en estas asociaciones. En el caso de los abusos físicos, la literatura previa apoyaría la hipótesis de que éstos provoquen un aumento de la metilación del gen; en el caso de los indicadores de gravedad, en cambio, no tenemos datos que nos permitan decantarnos fehacientemente por uno u otro sentido de la asociación. De hecho, un aspecto aún no aclarado sobre la metilación del ADN es si tiene lugar en las primeras etapas de la vida y permanece inalterable, o si por el contrario es un proceso dinámico sujeto a constante modulación por factores ambientales. Hay datos contradictorios al respecto. Se ha descrito, por ejemplo, que la metilación de los genes puede ser modificada a lo largo de la vida por factores como la dieta, el hábito tabáquico, los fármacos o la psicoterapia (Jaenisch & Bird, 2003; McGowan, Meaney, & Szyf, 2008; Perroud et al., 2013; Zeilinger et al., 2013). Sin embargo, en el caso concreto de la psicoterapia, parece que ésta podría afectar a genes como el *BDNF* y el *FKBP5*, y, en cambio, no al *GR* (Perroud et al., 2013; Yehuda et al., 2013). Por tanto, quizá la vulnerabilidad a los factores externos depende de cada gen, de tal forma que los factores que modifican la metilación de un gen determinado no afectan a la de otro. También podría depender del momento de exposición al factor ambiental. El grado de metilación del *GR* parece que se asocia con sucesos traumáticos en la infancia (Labonte et al., 2012; McGowan et al., 2009; Tyrka et al., 2012) y en la adolescencia (van der Knaap et al., 2014), y no en cambio con experiencias estresantes posteriores, como la guerra (Mulligan et al., 2012) o la violencia de género (Radtke et al., 2011). Esto iría a favor de la hipótesis propuesta por algunos autores según la cual el período para modificar la metilación del *GR* serían los primeros años de vida, y estas marcas epigenéticas persistirían en la edad adulta y conferirían vulnerabilidad para desarrollar psicopatología mediante la alteración del funcionamiento del eje HHA (McGowan et al., 2009; Meaney & Ferguson-Smith, 2010; Murgatroyd & Spengler, 2011; Tyrka et al., 2012; Yehuda et al., 2013). Sin embargo, aún faltan datos para extraer conclusiones firmes al respecto. Habida cuenta de todo lo expuesto, podemos interpretar la asociación entre metilación del *GR* y gravedad del TLP observada en nuestro estudio de dos formas diferentes. La primera es que los sucesos estresantes en la edad adulta también pueden alterar el grado de metilación de este gen. La segunda, que aquellos sujetos con mayor metilación de este gen tienen una mayor vulnerabilidad para desarrollar psicopatología y, por ende, para presentar más gravedad del TLP. Incluso podríamos llegar a plantearnos que esta susceptibilidad debida a una mayor metilación del gen fuese provocada por los antecedentes de abuso físico; nuestros resultados respaldan parcialmente esta

suposición puesto que las islas CpG metiladas que se asocian con el abuso físico sólo coinciden en parte con las que se asocian con la gravedad.

De todos los traumas infantiles evaluados sólo el abuso físico se asoció significativamente con el grado de metilación, y la negligencia emocional mostró una tendencia hacia la significación (así como asociaciones significativas con algunas islas CpG). Esto no coincide con los resultados del único estudio publicado hasta la fecha que investiga también la asociación entre traumas infantiles y metilación de este gen en el TLP (Perroud et al., 2011), en el que los traumas que se asociaron fueron el abuso sexual, la negligencia física y la repetición de los abusos. Las islas CpG más metiladas también diferían con las de nuestro estudio. Todas estas discrepancias podrían ser debidas a las diferencias demográficas y clínicas entre ambas muestras. Otra posible explicación sería que, más que el tipo de abuso en sí, lo que se asocie con una mayor metilación del *GR* sea el impacto que el abuso ejerce sobre el individuo. De hecho, éste es un aspecto que no se suele evaluar en los estudios que relacionan los antecedentes de traumas en la infancia con psicopatología. Por ejemplo, el CTQ-SF, uno de los cuestionarios más empleados, clasifica la gravedad de los traumas en función del número de ítems de cada tipo de trauma y la frecuencia de los mismos, pero no interroga específicamente sobre el impacto que causa el abuso en el individuo. Es, por tanto, un aspecto interesante a explorar en futuras investigaciones.

Adoptando una visión global de los resultados de los cuatro estudios que componen esta tesis doctoral, podríamos afirmar que parecen apoyar la implicación de factores genéticos y ambientales tanto en la etiología del TLP como en su gravedad sintomática. Los traumas en la infancia modularían la asociación entre genes de los sistemas de respuesta al estrés y el TLP, y en individuos que ya presentan la patología, se asociarían con una mayor gravedad del trastorno sobre todo en los casos con un elevado neuroticismo. Además, también se asociarían con una mayor metilación del *GR*, y ésta, a su vez, con la gravedad del trastorno. Una mención especial merecen el abuso y negligencia emocionales pues, además de facilitar el desarrollo del trastorno en caso de que un individuo tuviera determinadas variantes de genes implicados en la respuesta al estrés, como el resto de traumas infantiles, también jugarían un papel en la gravedad. Así, hemos visto cómo el abuso emocional se asocia con una mayor gravedad del TLP (Estudio 1), y cómo la negligencia emocional se asocia con una mayor metilación de las islas CpG 1, 2 y 3 (Estudio 4), y esta metilación en las islas CpG 2 y 3 se asocia con indicadores de gravedad del trastorno, con lo cual podríamos hipotetizar que los antecedentes de

abuso/negligencia emocional en la infancia, en caso de desarrollar TLP, podrían contribuir a que el trastorno fuera más grave a través del aumento de la metilación del *GR* y otros factores como el temperamento. Coincidiendo con otros autores nos parece, por tanto, que el papel de los traumas emocionales en el TLP es una interesante línea de investigación a seguir.

Yendo un paso más allá, si aunamos nuestros resultados con la literatura previa e interpretamos todo ello según la teoría de diátesis-estrés, podríamos plantear que existirían algunas variantes en genes de los sistemas de respuesta al estrés que provocarían una adaptación poco eficiente a los sucesos adversos y, por tanto, conferirían una mayor predisposición para desarrollar TLP ante la presencia de sucesos traumáticos en un momento tan vulnerable y crítico para el desarrollo de la personalidad como puede ser la infancia. Este estrés temprano, a su vez, podría alterar la expresión de algunos genes mediante procesos de metilación y conferir así también más vulnerabilidad para desarrollar el trastorno o para que éste sea grave. Parece incluso que los mismos genes estarían implicados en diversas patologías, con lo que probablemente la interacción entre abusos infantiles y genes de los sistemas de respuesta al estrés conferiría una mayor vulnerabilidad para presentar psicopatología en general (de Kloet et al., 2005), y el desarrollo de una u otra patología dependería de la combinación concreta de variaciones genéticas y abusos y/o de la presencia de otros factores predisponentes para la enfermedad.

---

**limitaciones**

---



Las limitaciones de cada uno de los estudios de esta tesis están detalladas en el apartado de discusión de los propios estudios. Hay una serie de limitaciones comunes, sin embargo, que se describen a continuación.

Una primera limitación estaría en relación con la evaluación de los traumas infantiles. Aunque el CTQ-SF es uno de los cuestionarios sobre este tipo de traumas más empleado en la investigación en salud mental, es autoaplicado, con lo que no tiene en cuenta la impresión de informadores externos. Además, recoge la información de forma retrospectiva, pudiendo verse afectado por sesgos, como por ejemplo el de memoria. Quizá el haber contado con la información de terceras personas nos podría haber aportado datos más fiables en algunos de los casos.

En línea con esta primera limitación tendríamos la segunda, que concierne a la elección de los traumas infantiles como factor ambiental de riesgo. Ya se ha comentado en la introducción que actualmente está considerado uno de los factores psicosociales primordiales en el desarrollo del TLP, pero también se han descrito otros que podrían influir en mayor o menor medida en el desarrollo de la enfermedad y que no hemos tenido en cuenta (por ejemplo, los valores familiares que favorecen la dependencia o los antecedentes familiares de trastornos afectivos o consumo de sustancias). Además, en el caso concreto del Estudio 4, hay factores no medidos que podrían influir en la metilación del *GR*, como la dieta o el tabaquismo.

Una tercera limitación tendría que ver con el grupo control empleado en los estudios de asociación caso-control (Estudios 2 y 3), pues no disponemos de datos sociodemográficos ni clínicos de dicho grupo. Los sujetos fueron seleccionados al azar de entre los donantes de sangre de uno de los tres hospitales colaboradores (Hospital de Vall d'Hebron), con lo que creemos que podrían ser representativos de la población general de nuestro entorno, entorno que es a su vez donde se reclutó la muestra de sujetos con TLP. Aunque no disponemos de información sociodemográfica que nos permita comparar a los controles con la población general, el hecho de ser un acto no compensado económicamente y bastante extendido entre la población, así como datos de otras muestras de donantes en nuestro país que indican que son principalmente gente de clase media con estudios secundarios o superiores (Martín Santana & Beerli Palacio, 2008), nos hace pensar que sí podrían ser representativos ([http://www.ine.es/ss/Satellite?L=es\\_ES&c=INESeccion\\_C&cid=1259925481659&p=1254735110672&pagename=ProductosYServicios%2FPYSLayout&param3=1259924822888](http://www.ine.es/ss/Satellite?L=es_ES&c=INESeccion_C&cid=1259925481659&p=1254735110672&pagename=ProductosYServicios%2FPYSLayout&param3=1259924822888)). Además,

por los propios criterios de exclusión de la donación de sangre, en principio deberían ser sujetos sin patología psiquiátrica aguda ni seguimiento psiquiátrico regular, así como tampoco usuarios de drogas vía parenteral o enfermos orgánicos graves. La propia evolución del TLP, que, tal y como muestran los estudios de seguimiento, suele ser hacia la remisión (Gunderson et al., 2011a; Paris & Zweig-Frank, 2001; Zanarini et al., 2006a), nos hace pensar que la prevalencia de sujetos con TLP entre los controles debería ser muy baja, puesto que en este grupo la edad media era de 53,5 años. Lo que no podemos inferir es la ausencia de traumas infantiles en el grupo control, pues, como hemos visto en la Introducción, no todas las víctimas de traumas en la infancia acaban desarrollando psicopatología. El carecer de este dato nos ha impedido evaluar el papel directo de los traumas infantiles en la etiología del TLP, y sólo se ha podido analizar su papel modulador en la asociación entre los polimorfismos de riesgo y el TLP en el grupo de pacientes.

Con respecto al grupo de pacientes, la patología de eje I no fue evaluada mediante entrevistas estructuradas, lo cual podría considerarse una pequeña limitación, pero sí mediante anamnesis por parte de psiquiatras experimentados. La patología de eje II, por el contrario, sí fue evaluada con una entrevista semi-estructurada (SCID-II) y, junto con una exhaustiva entrevista clínica, nos permitió asegurarnos de que el TLP fuera el diagnóstico principal en este eje.

La cuarta limitación importante es la selección de los genes y variantes de riesgo. Éstos se han elegido en base al conocimiento actual sobre la fisiopatología del TLP y trastornos relacionados, pero este conocimiento hoy en día sigue siendo muy escaso, con lo que existe la posibilidad de que no se hayan estudiado los polimorfismos o genes más susceptibles para el trastorno. Además, la elección de variantes de riesgo también puede verse complicada por el conocido sesgo de publicación, que dificulta la diseminación de resultados negativos. Otras causas que complicarían el estudio genético, no sólo del TLP sino de los trastornos psiquiátricos en general, serían la heterogeneidad clínica de los trastornos y los propios criterios diagnósticos, basados en constructos clínicos y no biológicos, la heterogeneidad de locus o genética (se da cuando la variación en diversos genes afecta al mismo fenotipo) y la penetrancia incompleta (tiene lugar cuando la probabilidad de observar un fenotipo específico en los portadores de un genotipo particular es inferior a 1) (Burmeister et al., 2008). Hay autores que proponen elegir como genes candidatos aquéllos que confieran vulnerabilidad para las causas ambientales de una enfermedad, en lugar de genes que causen directamente la



enfermedad (Amad et al., 2014). Otra opción sería realizar GWAS en lugar de estudio de genes candidatos, aunque para ello habría que ampliar mucho más el tamaño de las muestras (del orden de miles) (Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007), lo cual no es posible si no se realizan estudios colaborativos a nivel internacional y, por supuesto, con una gran financiación económica.

La quinta limitación es la pérdida de significación estadística al corregir por múltiples comparaciones empleando Bonferroni. Aunque se trate de un método demasiado restrictivo, como hemos comentado, esta limitación nos impide afirmar que los resultados de nuestros estudios confirman la implicación de genes de los sistemas de respuesta al estrés en el TLP, y sólo podemos decir que sugieren dicha implicación. Para corroborarlo o descartarlo habría que intentar replicar nuestros resultados en muestras independientes.

Como sexta y última limitación, englobamos todas las concernientes al estudio de metilación del *GR*. Ya están detalladas en dicho estudio, pero recordemos que serían principalmente el estudio del patrón de metilación en células periféricas en lugar de tejido cerebral, la elección de sólo unas pocas islas CpG del exón 1<sub>F</sub> de dicho gen, el no comprobar si las alteraciones en la metilación observadas correlacionan con cambios en la expresión del gen y la no evaluación de otros mecanismos epigenéticos que también podrían influir en la expresión del gen.



---

## **Conclusiones**

---



1. En la etiología del TLP estarían implicadas variantes de genes de los sistemas de respuesta al estrés, en concreto de los genes *FKBP5*, *CRHR1*, *COMT*, *DBH* y *SLC6A2*.
2. La asociación de estas variantes con el TLP estaría modulada por los antecedentes de traumas en la infancia, salvo las variantes de los genes *FKBP5* y *CRH1* que se asociarían independientemente de los traumas. En el gen *FKBP5* habría otros polimorfismos cuya asociación con el trastorno dependería de la modulación por los traumas infantiles, así como en el gen *CRHR2*.
3. Los traumas en la infancia, concretamente el abuso emocional, se asocia con una mayor gravedad sintomática del TLP, principalmente en aquellos sujetos con un elevado neuroticismo.
4. El abuso físico, y posiblemente la negligencia emocional, se asocian con una mayor metilación del *GR* en sujetos con TLP.
5. Una mayor metilación del *GR* en sujetos con TLP se asocia con variables que determinan una mayor gravedad del trastorno.



---

# **Implicaciones y futuras líneas**

---





Los resultados de esta tesis, globalmente, sugieren por primera vez la implicación de procesos de interacción entre genes de los sistemas de respuesta al estrés y sucesos traumáticos en la infancia en el desarrollo del TLP y en su gravedad. De verse confirmados en futuros estudios, podrían tener implicaciones a nivel preventivo y terapéutico, pues aconsejarían:

- realizar intervenciones tempranas en aquellos sujetos con vulnerabilidad genética para el desarrollo del TLP que hubieran sufrido algún tipo de suceso traumático en las primeras etapas de la vida,
- desarrollar estrategias terapéuticas centradas en el manejo del trauma,
- considerar los sistemas de respuesta al estrés del organismo como diana terapéutica,
- tener en consideración los rasgos temperamentales como factor condicionante de la gravedad del trastorno.

A partir de los hallazgos de la presente tesis se plantean como futuras líneas a seguir:

- replicación de los resultados de los estudios de asociación caso-control en muestras independientes. Además, teniendo en cuenta la sospecha de un origen poligénico, lo recomendable sería realizar GWAS mediante estudios colaborativos a gran escala,
- confirmación de que las alteraciones en el patrón de metilación del *GR* se traducen en unos menores niveles de proteína y/o en alteraciones del funcionamiento del eje HHA,
- comparación del patrón de metilación de genes en sujetos con TLP con controles, teniendo en cuenta la presencia de antecedentes de traumas en la infancia. Al igual que en el caso de las variantes genéticas, lo más recomendable sería la realización de EWAS para buscar alteraciones del patrón de metilación a nivel global,
- continuar evaluando otros factores que se pueden asociar con una mayor gravedad del trastorno (por ejemplo, genes de vulnerabilidad).



---

## **Bibliografía**

---



- Amad, A., Ramoz, N., Thomas, P., Jardri, R., & Gorwood, P. (2014). Genetics of borderline personality disorder: Systematic review and proposal of an integrative model. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, *40*, 6-19.
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (5th ed.). Arlington, VA: American Psychiatric Publishing.
- Andersen, S.L. (2003). Trajectories of brain development: Point of vulnerability or window of opportunity? *Neuroscience and biobehavioral reviews*, *27*, 3-18.
- Appel, K., Schwahn, C., Mahler, J., Schulz, A., Spitzer, C., Fenske, K., . . . Grabe, H.J. (2011). Moderation of adult depression by a polymorphism in the FKBP5 gene and childhood physical abuse in the general population. *Neuropsychopharmacology*, *36*, 1982-1991.
- Aubry, J.M., Dayer, A., Perroud, N., Piguet, C., Nallet, A., & Favre, S. (2014). Retraction. *The British journal of psychiatry*, *205*, 164.
- Baker, L.M., Williams, L.M., Korgaonkar, M.S., Cohen, R.A., Heaps, J.M., & Paul, R.H. (2013). Impact of early vs. late childhood early life stress on brain morphometrics. *Brain imaging and behavior*, *7*, 196-203.
- Bandelow, B., Krause, J., Wedekind, D., Broocks, A., Hajak, G., & Rütger, E. (2005). Early traumatic life events, parental attitudes, family history, and birth risk factors in patients with borderline personality disorder and healthy controls. *Psychiatry research*, *134*, 169-179.
- Baron, M., Gruen, R., Asnis, L., & Lord, S. (1985). Familial transmission of schizotypal and borderline personality disorders. *The American journal of psychiatry*, *142*, 927-934.
- Barrachina, J., Soler, J., Campins, M.J., Tejero, A., Pascual, J.C., Alvarez, E., . . . Pérez-Sola, V. (2004). Validation of a Spanish version of the diagnostic interview for borderlines revised (DIB-R). *Actas españolas de psiquiatría*, *32*, 293-298.
- Battle, C.L., Shea, M.T., Johnson, D.M., Yen, S., Zlotnick, C., Zanarini, M.C., . . . Morey, L.C. (2004). Childhood maltreatment associated with adult personality disorders: Findings from the Collaborative Longitudinal Personality Disorders Study. *Journal of personality disorders*, *18*, 193-211.
- Beauchaine, T.P., Klein, D.N., Crowell, S.E., Derbidge, C., & Gatzke-Kopp, L. (2009). Multifinality in the development of personality disorders: A biology x sex x environment interaction model of antisocial and borderline traits. *Development and psychopathology*, *21*, 735-770.
- Belsky, J. (1993). Etiology of child maltreatment: A developmental ecological analysis. *Psychological bulletin*, *114*, 413-434.
- Bernstein, D.P., Fink, L., Handelsman, L., Foote, J., Lovejoy, M., Wenzel, K., . . . Ruggiero, J. (1994). Initial reliability and validity of a new retrospective measure of child abuse and neglect. *The American journal of psychiatry*, *151*, 1132-1136.
- Bernstein, D.P., Stein, J.A., Newcomb, M.D., Walker, E., Pogge, D., Ahluvalia, T., . . . Zule, W. (2003). Development and validation of a brief screening version of the Childhood Trauma Questionnaire. *Child abuse & neglect*, *27*, 169-190.
- Binder, E.B., Bradley, R.G., Liu, W., Epstein, M.P., Deveau, T.C., Mercer, K.B., . . . Ressler, K.J. (2008). Association of FKBP5 polymorphisms and childhood abuse with risk of posttraumatic stress disorder symptoms in adults. *JAMA*, *299*, 1291-1305.
- Bock, J., Rether, K., Gröger, N., Xie, L., & Braun, K. (2014). Perinatal programming of emotional brain circuits: An integrative view from systems to molecules. *Frontiers in neuroscience*, *8*, 11.
- Boomsma, D., Busjahn, A., & Peltonen, L. (2002). Classical twin studies and beyond. *Nature reviews. Genetics*, *3*, 872-882.
- Bornoalova, M.A., Hicks, B.M., Iacono, W.G., & McGue, M. (2009). Stability, change, and heritability of borderline personality disorder traits from adolescence to adulthood: A longitudinal twin study. *Development and psychopathology*, *21*, 1335-1353.
- Bornoalova, M.A., Huibregtse, B.M., Hicks, B.M., Keyes, M., McGue, M., & Iacono, W. (2013). Tests of a direct effect of childhood abuse on adult borderline personality disorder traits: A longitudinal discordant twin design. *Journal of abnormal psychology*, *122*, 180-194.
- Boyce, W.T., & Ellis, B.J. (2005). Biological sensitivity to context: I. An evolutionary-developmental theory of the origins and functions of stress reactivity. *Development and psychopathology*, *17*, 271-301.

- Bradley, R.G., Binder, E.B., Epstein, M.P., Tang, Y., Nair, H.P., Liu, W., . . . Ressler, K.J. (2008). Influence of child abuse on adult depression: Moderation by the corticotropin-releasing hormone receptor gene. *Archives of general psychiatry*, *65*, 190-200.
- Bremner, J.D., Krystal, J.H., Southwick, S.M., & Charney, D.S. (1996). Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety: I. Preclinical studies. *Synapse*, *23*, 28-38.
- Bremner, J.D., & Vermetten, E. (2001). Stress and development: behavioral and biological consequences. *Development and psychopathology*, *13*, 473-489.
- Brown, T.A. (2007). Temporal course and structural relationships among dimensions of temperament and DSM-IV anxiety and mood disorder constructs. *Journal of abnormal psychology*, *116*, 313-328.
- Burmeister, M., McInnis, M.G., & Zöllner, S. (2008). Psychiatric genetics: Progress amid controversy. *Nature reviews. Genetics*, *9*, 527-540.
- Buttenschøn, H.N., Kristensen, A.S., Buch, H.N., Andersen, J.H., Bonde, J.P., Grynderup, M., . . . Mors, O. (2011). The norepinephrine transporter gene is a candidate gene for panic disorder. *Journal of neural transmission*, *118*, 969-976.
- Calati, R., Gressier, F., Balestri, M., & Serretti, A. (2013). Genetic modulation of borderline personality disorder: systematic review and meta-analysis. *Journal of psychiatric research*, *47*, 1275-1287.
- Caldji, C., Tannenbaum, B., Sharma, S., Francis, D., Plotsky, P.M., & Meaney, M.J. (1998). Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, *95*, 5335-5340.
- Carlson, M., & Earls, F. (1997). Psychological and neuroendocrinological sequelae of early social deprivation in institutionalized children in Romania. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *807*, 419-428.
- Carrasco, J.L., Díaz-Marsá, M., Pastrana, J.I., Molina, R., Brotons, L., López-Ibor, M.I., & López-Ibor, J.J. (2007). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis response in borderline personality disorder without post-traumatic features. *The British journal of psychiatry*, *190*, 357-358.
- Carvalho Fernando, S., Beblo, T., Schlosser, N., Terfehr, K., Otte, C., Löwe, B., . . . Wingenfeld, K. (2012). Associations of childhood trauma with hypothalamic-pituitary-adrenal function in borderline personality disorder and major depression. *Psychoneuroendocrinology*, *37*, 1659-1668.
- Caspi, A., McClay, J., Moffitt, T.E., Mill, J., Martin, J., Craig, I.W., . . . Poulton, R. (2002). Role of genotype in the cycle of violence in maltreated children. *Science*, *297*, 851-854.
- Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T.E., Taylor, A., Craig, I.W., Harrington, H., . . . Poulton, R. (2003). Influence of life stress on depression: Moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*, *301*, 386-389.
- Chen, B., Gu, T., Ma, B., Zheng, G., Ke, B., & Zhang, X. (2014). The CRHR1 gene contributes to genetic susceptibility of aggressive behavior towards others in Chinese southwest Han population. *Journal of molecular neuroscience*, *52*, 481-486.
- Chesin, M., Fertuck, E., Goodman, J., Lichenstein, S., & Stanley, B. (2015). The interaction between rejection sensitivity and emotional maltreatment in borderline personality disorder. *Psychopathology*, *48*, 31-35.
- Clarke, T.K., Dempster, E., Docherty, S.J., Desrivieres, S., Lourdsamy, A., Wodarz, N., . . . Schumann, G. (2012). Multiple polymorphisms in genes of the adrenergic stress system confer vulnerability to alcohol abuse. *Addiction biology*, *17*, 202-208.
- Cloninger, C.R., Przybeck, T.R., Svrakic, D.M., & Wetzel, R.D. (1994). *The Temperament and Character Inventory (TCI): A guide to its development and use*. St. Louis: Center for Psychobiology of Personality, Washington University.
- Collishaw, S., Pickles, A., Messer, J., Rutter, M., Shearer, C., & Maughan, B. (2007). Resilience to adult psychopathology following childhood maltreatment: Evidence from a community sample. *Child abuse & neglect*, *31*, 211-229.
- Concannon, P., Rich, S.S., & Nepom, G.T. (2009). Genetics of type 1A diabetes. *The New England journal of medicine*, *360*, 1646-1654.
- Crowell, S.E., Beauchaine, T.P., & Linehan, M.M. (2009). A biosocial developmental model of borderline personality: Elaborating and

- extending Linehan's theory. *Psychological bulletin*, *135*, 495-510.
- Dammann, G., Teschler, S., Haag, T., Altmüller, F., Tuczek, F., & Dammann, R.H. (2011). Increased DNA methylation of neuropsychiatric genes occurs in borderline personality disorder. *Epigenetics*, *6*, 1454-1462.
- De Bellis, M.D., Chrousos, G.P., Dorn, L.D., Burke, L., Halmers, K., Kling, M.A., . . . Putnam, F.W. (1994a). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation in sexually abused girls. *The journal of clinical endocrinology and metabolism*, *78*, 249-255.
- De Bellis, M.D., Keshavan, M.S., Clark, D.B., Casey, B.J., Giedd, J.N., Boring, A.M., . . . Ryan, N.D. (1999). A.E. Bennett Research Award. Developmental traumatology. Part II: Brain development. *Biological psychiatry*, *45*, 1271-1284.
- De Bellis, M.D., Lefter, L., Trickett, P.K., & Putnam, F.W. Jr. (1994b). Urinary catecholamine excretion in sexually abused girls. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, *33*, 320-327.
- de Kloet, E.R., Joëls, M., & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: From adaptation to disease. *Nature reviews. Neuroscience*, *6*, 463-475.
- Distel, M.A., Hottenga, J.J., Trull, T.J., & Boomsma, D.I. (2008a). Chromosome 9: Linkage for borderline personality disorder features. *Psychiatric genetics*, *18*, 302-327.
- Distel, M.A., Middeldorp, C.M., Trull, T.J., Derom, C.A., Willemsen, G., & Boomsma, D.I. (2011). Life events and borderline personality features: The influence of gene-environment interaction and gene-environment correlation. *Psychological medicine*, *41*, 849-860.
- Distel, M.A., Rebollo-Mesa, I., Willemsen, G., Derom, C.A., Trull, T.J., Martin, N.G., & Boomsma, D.I. (2009). Familial resemblance of borderline personality disorder features: Genetic or cultural transmission? *PLoS One*, *4*, e5334.
- Distel, M.A., Trull, T.J., Derom, C.A., Thiery, E.W., Grimmer, M.A., Martin, N.G., . . . Boomsma, D.I. (2008b). Heritability of borderline personality disorder features is similar across three countries. *Psychological medicine*, *38*, 1219-1229.
- Doll, A., Sorg, C., Manoliu, A., Woller, A., Meng, C., Forstl, H., . . . Riedl, V. (2013). Shifted intrinsic connectivity of central executive and salience network in borderline personality disorder. *Frontiers in human neuroscience*, *7*, 727.
- Engineer, N., Darwin, L., Nishigandh, D., Ngianga-Bakwin, K., Smith, S.C., & Grammatopoulos, D.K. (2013). Association of glucocorticoid and type 1 corticotropin-releasing hormone receptors gene variants and risk for depression during pregnancy and postpartum. *Journal of psychiatric research*, *47*, 1166-1173.
- Feliu-Soler, A., Pascual, J.C., Soler, J., Pérez, V., Armario, A., Carrasco, J., . . . Borràs, X. (2013). Emotional responses to a negative emotion induction procedure in borderline personality disorder. *International journal of clinical and health psychology*, *13*, 9-17.
- Fergusson, D.M., & Mullen, P.E. (1999). *Childhood sexual abuse: An evidence based perspective*. Thousand Oaks, CA: Sage Publications.
- Fossati, A., Madeddu, F., & Maffei, C. (1999). Borderline personality disorder and childhood sexual abuse: A meta-analytic study. *Journal of personality disorders*, *13*, 268-280.
- Ge, X., Conger, R.D., Cadoret, R.J., Neiderhiser, J.M., Yates, W., Troughton, E., & Stewart, M.A. (1996). The developmental interface between nature and nurture: A mutual influence model of child antisocial behavior and parent behaviors. *Developmental psychology*, *32*, 574-589.
- Gingnell, M., Comasco, E., Orelund, L., Fredrikson, M., & Sundström-Poromaa, I. (2010). Neuroticism-related personality traits are related to symptom severity in patients with premenstrual dysphoric disorder and to the serotonin transporter gene-linked polymorphism 5-HTTLPR. *Archives of women's mental health*, *13*, 417-423.
- Goenjian, A.K., Yehuda, R., Pynoos, R.S., Steinberg, A.M., Tashjian, M., Yang, R.K., . . . Fairbanks, L.A. (1996). Basal cortisol, dexamethasone suppression of cortisol, and MHPG in adolescents after the 1988 earthquake in Armenia. *The American journal of psychiatry*, *153*, 929-934.
- Golier, J.A., Yehuda, R., Bierer, L.M., New, A.S., Schmeidler, J., Silverman, J.M., & Siever, L.J.

- (2003). The relationship of borderline personality disorder to posttraumatic stress disorder and traumatic events. *The American journal of psychiatry*, *160*, 2018-2024.
- Gómez-Beneyto, M., Villar, M., Renovell, M., Pérez, M., Hernández, M., Leal, C., . . . Asencio, A. (1994). The diagnosis of personality disorder with a modified version of the SCID-II in a Spanish clinical sample. *Journal of personality disorders*, *8*, 104–110.
- Goodman, M., & Yehuda, R. (2002). The relationship between psychological trauma and borderline personality disorder. *Psychiatric annals*, *32*, 337-345.
- Grabe, H.J., Schwahn, C., Appel, K., Mahler, J., Schulz, A., & Spitzer, C. (2010). Childhood maltreatment, the corticotropin-releasing hormone receptor gene and adult depression in the general population. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics*, *153*, 1483-1493.
- Grant, B.F., Chou, S.P., Goldstein, R.B., Huang, B., Stinson, F.S., Saha, T.D., . . . Ruan, W.J. (2008). Prevalence, correlates, disability, and comorbidity of DSM-IV borderline personality disorder: results from the Wave 2 National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *The Journal of clinical psychiatry*, *69*, 533-545.
- Grant, J.E., Correia, S., Brennan-Krohn, T., Malloy, P.F., Laidlaw, D.H., & Schulz, S.C. (2007). Frontal white matter integrity in borderline personality disorder with self-injurious behavior. *The journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*, *19*, 383-390.
- Gross, R., Olfson, M., Gameroff, M., Shea, S., Feder, A., Fuentes, M., . . . Weissman, M.M. (2002). Borderline personality disorder in primary care. *Archives of internal medicine*, *162*, 53–60.
- Grossman, R., Yehuda, R., New, A., Schmeidler, J., Silverman, J., Mitropoulou, V., . . . Siever, L.J. (2003). Dexamethasone suppression test findings in subjects with personality disorders: Associations with posttraumatic stress disorder and major depression. *The American journal of psychiatry*, *160*, 1291-1298.
- Gunderson, J.G., Daversa, M.T., Grilo, C.M., McGlashan, T.H., Zanarini, M.C., Shea, M.T., . . . Stout, R.L. (2006). Predictors of 2-year outcome for patients with borderline personality disorder. *The American journal of psychiatry*, *163*, 822-826.
- Gunderson, J.G., Stout, R.L., McGlashan, T.H., Shea, M.T., Morey, L.C., Grilo, C.M., . . . Skodol, A.E. (2011a). Ten-year course of borderline personality disorder: psychopathology and function from the Collaborative Longitudinal Personality Disorders study. *Archives of general psychiatry*, *68*, 827-837.
- Gunderson, J.G., Zanarini, M.C., Choi-Kain, L.W., Mitchell, K.S., Jang, K.L., & Hudson, J.I. (2011b). Family study of borderline personality disorder and its sectors of psychopathology. *Archives of general psychiatry*, *68*, 753-762.
- Haenisch, B., Linsel, K., Brüss, M., Gilsbach, R., Propping, P., Nöthen, M.M., . . . Bönisch, H. (2009). Association of major depression with rare functional variants in norepinephrine transporter and serotonin1A receptor genes. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics*, *150B*, 1013-1016.
- Heim, C., Nater, U.M., Maloney, E., Boneva, R., Jones, J.F., & Reeves, W.C. (2009). Childhood trauma and risk for chronic fatigue syndrome: Association with neuroendocrine dysfunction. *Archives of general psychiatry*, *66*, 72-80.
- Hernandez, A., Arntz, A., Gaviria, A.M., Labad, A., & Gutiérrez-Zotes, J.A. (2012). Relationships between childhood maltreatment, parenting style, and borderline personality disorder criteria. *Journal of personality disorders*, *26*, 727-736.
- Hompes, T., Izzi, B., Gellens, E., Morreels, M., Fieuws, S., Pexsters, A., & Claes, S. (2013). Investigating the influence of maternal cortisol and emotional state during pregnancy on the DNA methylation status of the glucocorticoid receptor gene (NR3C1) promoter region in cord blood. *Journal of psychiatric research*, *47*, 880-891.
- Horeh, N., Nachshoni, T., Wolmer, L., & Toren, P. (2009). A comparison of life events in suicidal and nonsuicidal adolescents and young adults with major depression and borderline personality disorder. *Comprehensive psychiatry*, *50*, 496-502.
- Jaenisch, R., & Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics*, *33*, 245-254.
- Jang, K., Livesley, W.J., & Vernon, P.A. (1996). Heritability of the big five personality



- dimensions and their facets: A twin study. *Journal of personality*, *64*, 577–591.
- Johnson, B.A., Brent, D.A., Connolly, J., Bridge, J., Matta, J., Constantine, D., . . . White, T. (1995). Familial aggregation of adolescent personality disorders. *Journal of the American academy of child and adolescent psychiatry*, *34*, 798–804.
- Johnson, J.G., Cohen, P., Brown, J., Smailes, E.M., & Bernstein, D.P. (1999). Childhood maltreatment increases risk for personality disorders during early adulthood. *Archives of general psychiatry*, *56*, 600-606.
- Johnson, J.G., Cohen, P., Smailes, E.M., Skodol, A.E., Brown, J., & Oldham, J.M. (2001). Childhood verbal abuse and risk for personality disorders during adolescence and early adulthood. *Comprehensive psychiatry*, *42*, 16-23.
- Joyce, P.R., McHugh, P.C., Light, K.J., Rowe, S., Miller, A.L., & Kennedy, M.A. (2009). Relationships between angry-impulsive personality traits and genetic polymorphisms of the dopamine transporter. *Biological psychiatry*, *66*, 717-721.
- Joyce, P.R., McHugh, P.C., McKenzie, J.M., Sullivan, P.F., Mulder, R.T., Luty, S.E., . . . Kennedy, M.A. (2006). Dopamine transporter polymorphism is a risk factor for borderline personality disorder in depressed patients. *Psychological medicine*, *36*, 807-813.
- Kaufman, J., Birmaher, B., Perel, J., Dahl, R.E., Moreci, P., Nelson, B., . . . Ryan, N.D. (1997). The corticotropin-releasing hormone challenge in depressed abused, depressed nonabused, and normal control children. *Biological psychiatry*, *42*, 669-679.
- Kendler, K.S. (2013). What psychiatric genetics has taught us about the nature of psychiatric illness and what is left to learn. *Molecular psychiatry*, *18*, 1058-1066.
- Kendler, K.S., Aggen, S.H., Czajkowski, N., Røysamb, E., Tambs, K., Torgersen, S., . . . Reichborn-Kjennerud, T. (2008). The structure of genetic and environmental risk factors for DSM-IV personality disorders: A multivariate twin study. *Archives of general psychiatry*, *65*, 1438–1446.
- Kim, C.H., Hahn, M.K., Joung, Y., Anderson, S.L., Steele, A.H., Mazei-Robinson, M.S., . . . Kim, K.S. (2006). A polymorphism in the norepinephrine transporter gene alters promoter activity and is associated with attention-deficit hyperactivity disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, *103*, 19164-19169.
- Kim, Y.K., Hwang, J.A., Lee, H.J., Yoon, H.K., Ko, Y.H., Lee, B.H., . . . Na, K.S. (2014). Association between norepinephrine transporter gene (SLC6A2) polymorphisms and suicide in patients with major depressive disorder. *Journal of affective disorders*, *158*, 127-132.
- Kirschbaum, C., Pirke, K.M., & Hellhammer, D.H. (1993). The 'Trier Social Stress Test' -a tool for investigating psychobiological stress responses in a laboratory setting. *Neuropsychobiology*, *28*, 76-81.
- Kolla, N.J., Chiuccariello, L., Wilson, A.A., Houle, S., Links, P., Bagby, R.M., . . . Meyer, J.H. (2014). Elevated monoamine oxidase-A distribution volume in borderline personality disorder is associated with severity across mood symptoms, suicidality, and cognition. *Biological psychiatry*, *Dec 16*.
- Kuo, J.R., Khoury, J.E., Metcalfe, R., Fitzpatrick, S., & Goodwill, A. (2015). An examination of the relationship between childhood emotional abuse and borderline personality disorder features: The role of difficulties with emotion regulation. *Child abuse & neglect*, *39*, 147-155.
- Labonte, B., Yerko, V., Gross, J., Mechawar, N., Meaney, M.J., Szyf, M., & Turecki, G. (2012). Differential glucocorticoid receptor exon 1(B), 1(C), and 1(H) expression and methylation in suicide completers with a history of childhood abuse. *Biological psychiatry*, *72*, 41-48.
- Lahey, B.B. (2009). Public health significance of neuroticism. *The American psychologist*, *64*, 241-256.
- Lang, P., Ohman, A., & Vaitl, D. (1988). *The international affective picture system*. Gainesville: University of Florida, Centre for Research in Psychophysiology.
- Lange, W., Wulff, H., Berea, C., Beblo, T., Saavedra, A.S., Mensebach, C., . . . Driessen, M. (2005). Dexamethasone suppression test in borderline personality disorder - effects of posttraumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology*, *30*, 919-923.
- Laporte, L., Paris, J., Guttman, H., & Russell, J. (2011). Psychopathology, childhood trauma, and personality traits in patients with borderline personality disorder and their sisters. *Journal of personality disorders*, *25*, 448-462.

- Lazzaretti, M., Fabbro, D., Sala, M., Del Toso, K., de Vidovich, G., Marraffini, E., . . . Brambilla, P. (2013). Association between low-activity allele of catecholamine-O-methyl-transferase (COMT) and borderline personality disorder in an Italian population. *Behavioral medicine, 39*, 25-28.
- Leichsenring, F., Leibing, E., Kruse, J., New, A.S., & Leweke, F. (2011). Borderline personality disorder. *Lancet, 377*, 74-84.
- Lemieux, A.M., & Coe, C.L. (1995). Abuse-related posttraumatic stress disorder: Evidence for chronic neuroendocrine activation in women. *Psychosomatic medicine, 57*, 105-115.
- Lenzenweger, M., Lane, M., Loranger, A., & Kessler, R. (2007). Personality disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Biological psychiatry, 62*, 553-564.
- Levine, S. (1962). The effects of infantile experience on adult behavior. En A.J. Bachrach (Ed.), *Experimental foundations of clinical psychology* (pp. 139-169). New York: Basic Books.
- Levine, S. (1994). The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Annals of the New York Academy of Sciences, 746*, 275-293.
- Lieb, K., Zanarini, M.C., Schmahl, C., Linehan, M.M., & Bohus, M. (2004). Borderline personality disorder. *Lancet, 364*, 453-461.
- Linehan, M. (1987). Dialectical behavior therapy for borderline personality disorder: Theory and method. *Bulletin of the Menninger Clinic, 51*, 261-276.
- Links, P.S., Steiner, M., & Huxley, G. (1988). The occurrence of borderline personality disorder in the families of borderline patients. *Journal of personality disorders, 2*, 14-20.
- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., . . . Meaney, M.J. (1997). Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science, 277*, 1659-1662.
- Liu, Z., Zhu, F., Wang, G., Xiao, Z., Wang, H., & Tang, J. (2006). Association of corticotropin-releasing hormone receptor 1 gene SNP and haplotype with major depression. *Neuroscience letters, 404*, 358-362.
- Lobbestael, J., Arntz, A., & Bernstein, D.P. (2010). Disentangling the relationship between different types of childhood maltreatment and personality disorders. *Journal of personality disorders, 24*, 285-295.
- Loman, M.M., Gunnar, M.R., & Early Experience, Stress, and Neurobehavioral Development Center. (2010). Early experience and the development of stress reactivity and regulation in children. *Neuroscience and biobehavioral reviews, 34*, 867-876.
- Loranger, A.W., Oldham, J.M., & Tulis, E.H. (1982). Familial transmission of DSM-III borderline personality disorder. *Archives of general psychiatry, 39*, 795-799.
- Lubke, G.H., Laurin, C., Amin, N., Hottenga, J.J., Willemsen, G., van Grootheest, G., . . . Boomsma, D.I. (2014). Genome-wide analyses of borderline personality features. *Molecular psychiatry, 19*, 923-929.
- Lupien, S.J., McEwen, B.S., Gunnar, M.R., & Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature reviews. Neuroscience, 10*, 434-445.
- Lyons-Ruth, K., Holmes, B.M., Sasvari-Szekely, M., Ronai, Z., Nemoda, Z., & Pauls, D. (2007). Serotonin transporter polymorphism and borderline or antisocial traits among low-income young adults. *Psychiatric genetics, 17*, 339-343.
- Martín Santana, J.D., & Beerli Palacio, A. (2008). El comportamiento del donante de sangre desde la perspectiva del márketing social: factoresdeterminantes de la predisposición a donar. *Revista española de investigación de marketing ESIC, 12*, 27-41.
- Maurex, L., Zaboli, G., Ohman, A., Asberg, M., & Leopardi, R. (2010). The serotonin transporter gene polymorphism (5-HTTLPR) and affective symptoms among women diagnosed with borderline personality disorder. *European psychiatry, 25*, 19-25.
- McGowan, P.O., Meaney, M.J., & Szyf, M. (2008). Diet and the epigenetic (re)programming of phenotypic differences in behavior. *Brain research, 1237*, 12-24.
- McGowan, P.O., Sasaki, A., D'Alessio, A.C., Dymov, S., Labonte, B., Szyf, M., . . . Meaney, M.J. (2009). Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nature neuroscience, 12*, 342-348.

- Meaney, M.J., & Ferguson-Smith, A.C. (2010). Epigenetic regulation of the neural transcriptome: The meaning of the marks. *Nature neuroscience*, *13*, 1313-1318.
- Mehta, D., Gonik, M., Klengel, T., Rex-Haffner, M., Menke, A., & Rubel, J. (2011). Using polymorphisms in FKBP5 to define biologically distinct subtypes of posttraumatic stress disorder: Evidence from endocrine and gene expression studies. *Archives of general psychiatry*, *68*, 901-910.
- Miller, S.A., Dykes, D.D., & Polesky, H. (1989). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*, *16*, 1215.
- Minzenberg, M.J., Fan, J., New, A.S., Tang, C.Y., & Siever, L.J. (2008). Frontolimbic structural changes in borderline personality disorder. *Journal of psychiatric research*, *42*, 727-733.
- Mobascher, A., Bohus, M., Dahmen, N., Dietl, L., Giegling, I., Jungkunz, M., . . . Lieb, K. (2014). Association between dopa decarboxylase gene variants and borderline personality disorder. *Psychiatry research*, *219*, 693-695.
- Mulligan, C.J., D'Errico, N.C., Stees, J., & Hughes, D.A. (2012). Methylation changes at NR3C1 in newborns associate with maternal prenatal stress exposure and newborn birth weight. *Epigenetics*, *7*, 853-857.
- Murgatroyd, C., & Spengler, D. (2011). Epigenetics of early child development. *Frontiers in psychiatry*, *2*, 16.
- Nater, U.M., Bohus, M., Abbruzzese, E., Ditzen, B., Gaab, J., Kleindienst, N., . . . Ehlert, U. (2010). Increased psychological and attenuated cortisol and alpha-amylase responses to acute psychosocial stress in female patients with borderline personality disorder. *Psychoneuroendocrinology*, *35*, 1565-1572.
- National Institute for Clinical Excellence (NICE). (2009). *Borderline personality disorder: Treatment and management. Clinical Guideline*. London: NICE.
- Nemoda, Z., Lyons-Ruth, K., Szekely, A., Bertha, E., Faludi, G., & Sasvari-Szekely, M. (2010). Association between dopaminergic polymorphisms and borderline personality traits among at-risk young adults and psychiatric inpatients. *Behavioral and brain functions*, *6*, 4.
- Ni, X., Bismil, R., Chan, K., Sicard, T., Bulgin, N., McMMain, S., & Kennedy, J.L. (2006a). Serotonin 2A receptor gene is associated with personality traits, but not to disorder, in patients with borderline personality disorder. *Neuroscience letters*, *408*, 214-219.
- Ni, X., Chan, K., Bulgin, N., Sicard, T., Bismil, R., McMMain, S., & Kennedy, J.L. (2006b). Association between serotonin transporter gene and borderline personality disorder. *Journal of psychiatric research*, *40*, 448-453.
- Ni, X., Chan, D., Chan, K., McMMain, S., & Kennedy J.L. (2009). Serotonin genes and gene-gene interactions in borderline personality disorder in a matched case-control study. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, *33*, 128-133.
- Ni, X., Sicard, T., Bulgin, N., Bismil, R., Chan, K., McMMain, S., & Kennedy, J.L. (2007). Monoamine oxidase A gene is associated with borderline personality disorder. *Psychiatric genetics*, *17*, 153-157.
- Oberlander, T.F., Weinberg, J., Papsdorf, M., Grunau, R., Misri, S., & Devlin, A.M. (2008). Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses. *Epigenetics*, *3*, 97-106.
- O'Connor, T.G., Deater-Deckard, K., Fulker, D., Rutter, M., & Plomin, R. (1998). Genotype-environment correlations in late childhood and early adolescence: Antisocial behavioral problems and coercive parenting. *Developmental psychology*, *34*, 970-981.
- Oldham, J.M. (2006). Borderline personality disorder and suicidality. *The American journal of psychiatry*, *163*, 20-26.
- Packan, D.R., & Sapolsky, R.M. (1990). Glucocorticoid endangerment of the hippocampus: Tissue, steroid and receptor specificity. *Neuroendocrinology*, *51*, 613-618.
- Panagopoulos, V.N., Trull, T.J., Glowinski, A.L., Lynskey, M.T., Heath, A.C., Agrawal, A., . . . Nelson, E.C. (2013). Examining the association of NRXN3 SNPs with borderline personality disorder phenotypes in heroin dependent cases and socio-economically disadvantaged controls. *Drug and alcohol dependence*, *128*, 187-193.
- Paris, J., & Zweig-Frank, H. (2001). A 27-year follow-up of patients with borderline personality disorder. *Comprehensive psychiatry*, *42*, 482-487.

- Pascual, J.C., Soler, J., Baiget, M., Cortés, A., Menoyo, A., Barrachina, J., . . . Perez, V. (2007). Association between the serotonin transporter gene and personality traits in borderline personality disorder patients evaluated with Zuckerman-Zuhlman Personality Questionnaire (ZKPQ). *Actas españolas de psiquiatría, 35*, 382-386.
- Pascual, J.C., Soler, J., Barrachina, J., Campins, M.J., Alvarez, E., Pérez, V., . . . Baiget, M. (2008). Failure to detect an association between the serotonin transporter gene and borderline personality disorder. *Journal of psychiatric research, 42*, 87-88.
- Perez-Rodriguez, M.M., Weinstein, S., New, A.S., Bevilacqua, L., Yuan, Q., Zhou, Z., ... Siever, L.J. (2010). Tryptophan-hydroxylase 2 haplotype association with borderline personality disorder and aggression in a sample of patients with personality disorders and healthy controls. *Journal of psychiatric research, 44*, 1075-1081.
- Perneger, T.V. (1998). What's wrong with Bonferroni adjustments. *British medical journal, 316*, 1236-1238.
- Perroud, N., Paoloni-Giacobino, A., Prada, P., Olie, E., Salzman, A., Nicasro, R., . . . Malafosse, A. (2011). Increased methylation of glucocorticoid receptor gene (NR3C1) in adults with a history of childhood maltreatment: A link with the severity and type of trauma. *Translational psychiatry, 1*, e59.
- Perroud, N., Salzman, A., Prada, P., Nicasro, R., Hoeppli, M.E., Furrer, S., . . . Malafosse, A. (2013). Response to psychotherapy in borderline personality disorder and methylation status of the BDNF gene. *Translational psychiatry, 3*, e207.
- Plomin, R., DeFries, J.C., & Loehlin, J.C. (1977). Genotype-environment interaction and correlation in the analysis of human behavior. *Psychological bulletin, 84*, 309-322.
- Plomin, R., DeFries, J. C., McClearn, G. E., & Rutter, M. (1997). *Behavioral genetics* (3rd ed.). New York: Freeman.
- Pope, H.G. Jr., Jonas, J.M., Hudson, J.I., Cohen, B.M., & Gunderson, J.G. (1983). The validity of DSM-III borderline personality disorder. A phenomenologic, family history, treatment response, and long-term follow-up study. *Archives of general psychiatry, 40*, 23-30.
- Prados, J., Stenz, L., Courtet, P., Prada, P., Nicasro, R., Adouan, W., . . . Perroud, N. (2015). Borderline personality disorder and childhood maltreatment: A genome-wide methylation analysis. *Genes, brain, and behavior, 14*, 177-188.
- Preuss, U.W., Wurst, F.M., Ridinger, M., Rujescu, D., Fehr, C., Koller, G., . . . Zill, P. (2013). Association of functional DBH genetic variants with alcohol dependence risk and related depression and suicide attempt phenotypes: Results from a large multicenter association study. *Drug and alcohol dependence, 133*, 459-467.
- Psychiatric GWAS Consortium Bipolar Disorder Working Group. (2011). Large-scale genome-wide association analysis of bipolar disorder identifies a new susceptibility locus near ODZ4. *Nature genetics, 43*, 977-983.
- Radtke, K.M., Ruf, M., Gunter, H.M., Dohrmann, K., Schauer, M., Meyer, A., & Elbert, T. (2011). Transgenerational impact of intimate partner violence on methylation in the promoter of the glucocorticoid receptor. *Translational psychiatry, 1*, e21.
- Reich, J.H. (1989). Familiality of DSM-III dramatic and anxious personality clusters. *The journal of nervous and mental disease, 177*, 96-100.
- Reichborn-Kjennerud, T., Czajkowski, N., Røysamb, E., Ørstavik, R.E., Neale, M.C., Torgersen, S., & Kendler, K.S. (2010). Major depression and dimensional representations of DSM-IV personality disorders: A population-based twin study. *Psychological medicine, 40*, 1475-1484.
- Riemann, R., Angleitner, A., & Strelau, J. (2006). Genetic and environmental influences on personality: A study of twins reared together using the self and peer report NEO-FFI scales. *Journal of personality, 65*, 449-475.
- Rinne, T., de Kloet, E.R., Wouters, L., Goekoop, J.G., DeRijk, R.H., & van den Brink, W. (2002). Hyperresponsiveness of hypothalamic-pituitary-adrenal axis to combined dexamethasone/corticotropin-releasing hormone challenge in female borderline personality disorder subjects with a history of sustained childhood abuse. *Biological psychiatry, 52*, 1102-1112.
- Ripke, S., O'Dushlaine, C., Chambert, K., Moran, J.L., Kähler, A.K., Akterin, S., . . . Sullivan, P.F.

- (2013). Genome-wide association analysis identifies 13 new risk loci for schizophrenia. *Nature genetics*, *45*, 1150-1159.
- Risch, N., & Merikangas, K. (1996). The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*, *273*, 1516-1517.
- Riso, L.P., Klein, D.N., Anderson, R.L., & Ouimette, P.C. (2000). A family study of outpatients with borderline personality disorder and no history of mood disorder. *Journal of personality disorders*, *14*, 208-217.
- Ruocco, A.C., Amirthavasagam, S., Choi-Kain, L.W., & McMain, S.F. (2013). Neural correlates of negative emotionality in borderline personality disorder: An activation-likelihood-estimation meta-analysis. *Biological psychiatry*, *73*, 153-160.
- Ruocco, A.C., Amirthavasagam, S., & Zakzanis, K.K. (2012). Amygdala and hippocampal volume reductions as candidate endophenotypes for borderline personality disorder: A meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Psychiatry research*, *201*, 245-252.
- Rüsçh, N., Weber, M., Il'yasov, K.A., Lieb, K., Ebert, D., Hennig, J., & van Elst, L.T. (2007). Inferior frontal white matter microstructure and patterns of psychopathology in women with borderline personality disorder and comorbid attention-deficit hyperactivity disorder. *Neuroimage*, *35*, 738-747.
- Schienze, A., Leutgeb, V., & Wabnegger, A. (2015). Symptom severity and disgust-related traits in borderline personality disorder: The role of amygdala subdivisions. *Psychiatry research*, *232*, 203-207.
- Schuppert, H.M., Albers, C.J., Minderaa, R.B., Emmelkamp, P.M., & Nauta, M.H. (2015). Severity of borderline personality symptoms in adolescence: Relationship with maternal parenting stress, maternal psychopathology, and rearing styles. *Journal of personality disorders*, *29*, 289-302.
- Schwandt, M.L., Heilig, M., Hommer, D.W., George, D.T., & Ramchandani, V.A. (2013). Childhood trauma exposure and alcohol dependence severity in adulthood: Mediation by emotional abuse severity and neuroticism. *Alcoholism, clinical and experimental research*, *37*, 984-992.
- Scott, L.N., Levy, K.N., & Granger, D.A. (2013). Biobehavioral reactivity to social evaluative stress in women with borderline personality disorder. *Personality disorders*, *4*, 91-100.
- Silk, K.R., Lee, S., Hill, E.M., & Lohr, N.E. (1995). Borderline personality disorder symptoms and severity of sexual abuse. *The American journal of psychiatry*, *152*, 1059-1064.
- Simeon, D., Knutelska, M., Smith, L., Baker, B.R., & Hollander, E. (2007). A preliminary study of cortisol and norepinephrine reactivity to psychosocial stress in borderline personality disorder with high and low dissociation. *Psychiatry research*, *149*, 177-184.
- Skodol, A.E., Siever, L.J., Livesley, W.J., Gunderson, J.G., Pfohl, B., & Widiger, T.A. (2002). The borderline diagnosis II: biology, genetics, and clinical course. *Biological psychiatry*, *51*, 951-963.
- Smith, G.W., Aubry, J.M., Dellu, F., Contarino, A., Bilezikjian, L.M., & Gold, L.H. (1998). Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. *Neuron*, *20*, 1093-1102.
- Soloff, P.H., Lynch, K.G., & Kelly, T.M. (2002). Childhood abuse as a risk factor for suicidal behavior in borderline personality disorder. *Journal of personality disorders*, *16*, 201-214.
- Spataro, J., Mullen, P.E., Burgess, P.M., Wells, D.L., & Moss, S.A. (2004). Impact of child sexual abuse on mental health: Prospective study in males and females. *The British journal of psychiatry*, *184*, 416-421.
- Stanley, B., & Siever, L.J. (2010). The interpersonal dimension of borderline personality disorder: Toward a neuropeptide model. *The American journal of psychiatry*, *167*, 24-39.
- Sterling, P., & Eyer, J. (1988). Allostasis: A new paradigm to explain arousal pathology. En S. Fisher & J. Reason (Eds.), *Handbook of Life Stress, Cognition, and Health* (pp. 629-649). New York: John Wiley & Sons.
- Stone, M.H., Kahn, E., & Flye, B. (1981). Psychiatrically ill relatives of borderline patients: A family study. *The psychiatric quarterly*, *53*, 71-84.
- Swartz, M., Blazer, D., George, L., & Winfield, I. (1990). Estimating the prevalence of borderline personality disorder in the community. *Journal of Personality Disorders*, *4*, 257-272.

- Tadić, A., Baskaya, O., Victor, A., Lieb, K., Höppner, W., & Dahmen, N. (2008). Association analysis of SCN9A gene variants with borderline personality disorder. *Journal of psychiatric research, 43*, 155-163.
- Tadić, A., Elsässer, A., Storm, N., Baade, U., Wagner, S., Baškaya, O., . . . Dahmen, N. (2010). Association analysis between gene variants of the tyrosine hydroxylase and the serotonin transporter in borderline personality disorder. *The world journal of biological psychiatry, 11*, 45-58.
- Tadić, A., Elsässer, A., Victor, A., von Cube, R., Baškaya, O., Wagner, S., . . . Dahmen, N. (2009a). Association analysis of serotonin receptor 1B (HTR1B) and brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms in Borderline personality disorder. *Journal of neural transmission, 116*, 1185-1188.
- Tadić, A., Victor, A., Baškaya, O., von Cube, R., Hoch, J., Kouti, I., . . . Dahmen, N. (2009b). Interaction between gene variants of the serotonin transporter promoter region (5-HTTLPR) and catechol O-methyltransferase (COMT) in borderline personality disorder. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics, 150B*, 487-495.
- Tebartz van Elst, L., Hesslinger, B., Thiel, T., Geiger, E., Haegele, K., Lemieux, L., . . . Ebert, D. (2003). Frontolimbic brain abnormalities in patients with borderline personality disorder: A volumetric magnetic resonance imaging study. *Biological psychiatry, 54*, 163-171.
- Teicher, M.H., Anderson, C.M., & Polcari, A. (2012). Childhood maltreatment is associated with reduced volume in the hippocampal subfields CA3, dentate gyrus, and subiculum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 109*, 563-572.
- Timpl, P., Spanagel, R., Sillaber, I., Kresse, A., Reul, J.M., & Stalla, G.K. (1998). Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotrophin releasing hormone receptor. *Nature genetics, 19*, 162-166.
- Togsverd, M., Werge, T.M., Tankó, L.B., Bagger, Y.Z., Hansen, T., Qin, G., . . . Rasmussen, H.B. (2008). Association of a dopamine beta-hydroxylase gene variant with depression in elderly women possibly reflecting noradrenergic dysfunction. *Journal of affective disorders, 106*, 169-172.
- Torgersen, J. (2005). Epidemiology. En J. Oldham, A.E. Skodol, & D.S. Bender (Eds.), *Textbook of personality disorders* (pp. 129-141). Washington, DC: American Psychiatric Publishing.
- Torgersen, S. (1984). Genetic and nosological aspects of schizotypal and borderline personality disorders. A twin study. *Archives of general psychiatry, 41*, 546-554.
- Torgersen, S., Czajkowski, N., Jacobson, K., Reichborn-Kjennerud, T., Røysamb, E., Neale, M.C., & Kendler, K.S. (2008). Dimensional representations of DSM-IV cluster B personality disorders in a population-based sample of Norwegian twins: A multivariate study. *Psychological medicine, 38*, 1617-1625.
- Torgersen, S., Lygren, S., Oien, P.A., Skre, I., Onstad, S., Edvardsen J., . . . Kringlen, E. (2000). A twin study of personality disorders. *Comprehensive psychiatry, 41*, 416-425.
- Torgersen, S., Myers, J., Reichborn-Kjennerud, T., Røysamb, E., Kubarych, T.S., & Kendler, K.S. (2012). The heritability of Cluster B personality disorders assessed both by personal interview and questionnaire. *Journal of personality disorders, 26*, 848-866.
- Touma, C., Gassen, N.C., Herrmann, L., Cheung-Flynn, J., Büll, D.R., & Ionescu, I.A. (2011). FK506 binding protein 5 shapes stress responsiveness: Modulation of neuroendocrine reactivity and coping behavior. *Biological psychiatry, 70*, 928-936.
- Tyrka, A.R., Price, L.H., Marsit, C., Walters, O.C., & Carpenter, L.L. (2012). Childhood adversity and epigenetic modulation of the leukocyte glucocorticoid receptor: Preliminary findings in healthy adults. *PLoS One, 7*, e30148.
- van der Knaap, L.J., Riese, H., Hudziak, J.J., Verbiest, M.M., Verhulst, F.C., Oldehinkel, A.J., & van Oort, F.V. (2014). Glucocorticoid receptor gene (NR3C1) methylation following stressful events between birth and adolescence. The TRAILS study. *Translational psychiatry, 4*, e381.
- van Harmelen, A.L., van Tol, M.J., van der Wee, N.J., Veltman, D.J., Aleman, A., Spinhoven, P., . . . Elzinga, B.M. (2010). Reduced medial prefrontal cortex volume in adults reporting childhood emotional maltreatment. *Biological psychiatry, 68*, 832-838.
- Vasta, R. (1982). Physical child abuse: A dual-component analysis. *Developmental review, 2*, 125-149.

- Vogel, F., Wagner, S., Başkaya, O., Leuenberger, B., Mobascher, A., Dahmen, N., . . . Tadić, A. (2012). Variable number of tandem repeat polymorphisms of the arginine vasopressin receptor 1A gene and impulsive aggression in patients with borderline personality disorder. *Psychiatric genetics*, *22*, 105-106.
- Wagner, S., Baskaya, O., Anicker, N.J., Dahmen, N., Lieb, K., & Tadić, A. (2010a). The catechol o-methyltransferase (COMT) val(158)met polymorphism modulates the association of serious life events (SLE) and impulsive aggression in female patients with borderline personality disorder (BPD). *Acta psychiatrica Scandinavica*, *122*, 110-117.
- Wagner, S., Baskaya, O., Dahmen, N., Lieb, K., & Tadić, A. (2010b). Modulatory role of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism on the effects of serious life events on impulsive aggression in borderline personality disorder. *Genes, brain, and behavior*, *9*, 97-102.
- Wagner, S., Baskaya, O., Lieb, K., Dahmen, N., & Tadić, A. (2009). The 5-HTTLPR polymorphism modulates the association of serious life events (SLE) and impulsivity in patients with borderline personality disorder. *Journal of psychiatric research*, *43*, 1067-1672.
- Wagner, S., Baskaya, O., Lieb, K., Dahmen, N., & Tadić, A. (2010c). Lack of modulating effects of the COMT Val(158)Met polymorphism on the association of serious life events (SLE) and impulsivity in patients with borderline personality disorder. *Journal of psychiatric research*, *44*, 121-122.
- Wasserman, D., Sokolowski, M., Rozanov, V., & Wasserman, J. (2008). The CRHR1 gene: A marker for suicidality in depressed males exposed to low stress. *Genes, brain, and behavior*, *7*, 14-19.
- Weaver, I.C., Cervoni, N., Champagne, F.A., D'Alessio, A.C., Sharma, S., Seckl, J.R., . . . Meaney, M.J. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature neuroscience*, *7*, 847-854.
- Wellcome Trust Case Control Consortium. (2007). Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*, *447*, 661-678.
- Weller, E.B., Weller, R.A., Fristad, M.A., & Bowes, J.M. (1990). Dexamethasone suppression test and depressive symptoms in bereaved children: A preliminary report. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*, *2*, 418-421.
- Widom, C.S., Czaja, S.J., & Paris, J. (2009). A prospective investigation of borderline personality disorder in abused and neglected children followed up into adulthood. *Journal of personality disorders*, *23*, 433-446.
- Wilson, S.T., Stanley, B., Brent, D.A., Oquendo, M.A., Huang, Y.Y., Haghghi, F., . . . Mann, J.J. (2012). Interaction between tryptophan hydroxylase I polymorphisms and childhood abuse is associated with increased risk for borderline personality disorder in adulthood. *Psychiatric genetics*, *22*, 15-24.
- Wilson, S.T., Stanley, B., Brent, D.A., Oquendo, M.A., Huang, Y.Y., & Mann, J.J. (2009). The tryptophan hydroxylase-1 A218C polymorphism is associated with diagnosis, but not suicidal behavior, in borderline personality disorder. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics*, *150B*, 202-208.
- Wingenfeld, K., Spitzer, C., Rullkötter, N., & Löwe, B. (2010). Borderline personality disorder: hypothalamus pituitary adrenal axis and findings from neuroimaging studies. *Psychoneuroendocrinology*, *35*, 154-170.
- Witt, S.H., Kleindienst, N., Frank, J., Treutlein, J., Mühleisen, T., Degenhardt, F., . . . Bohus, M. (2014). Analysis of genome-wide significant bipolar disorder genes in borderline personality disorder. *Psychiatric genetics*, *24*, 262-265.
- Wohnik, G.M., Rüegg, J., Abel, G.A., Schmidt, U., Holsboer, F., & Rein, T. (2005). FK506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells. *The journal of biological chemistry*, *280*, 4609-4616.
- Wolf, R.C., Sambataro, F., Vasic, N., Schmid, M., Thomann, P.A., Bientreue, S.D., & Wolf, N.D. (2011). Aberrant connectivity of resting-state networks in borderline personality disorder. *Journal of psychiatry & neuroscience*, *36*, 402-411.
- Wood, J.G., Joyce, P.R., Miller, A.L., Mulder, R.T., & Kennedy, M.A. (2002). A polymorphism in the dopamine beta-hydroxylase gene is associated with "paranoid ideation" in patients with major depression. *Biological psychiatry*, *51*, 365-369.

- Woon, F.L., & Hedges, D.W. (2008). Hippocampal and amygdala volumes in children and adults with childhood maltreatment-related posttraumatic stress disorder: A meta-analysis. *Hippocampus*, *18*, 729-736.
- Wyszynski, D.F. (1998). La epidemiología genética: disciplina científica en expansión. *Pan American journal of public health*, *3*, 26-34.
- Xie, P., Kranzler, H.R., Poling, J., Stein, M.B., Anton, R.F., & Farrer, L. (2010). Interaction of FKBP5 with childhood adversity on risk for post-traumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology*, *35*, 1684-1692.
- Yehuda, R. (2000). Biology of posttraumatic stress disorder. *The Journal of clinical psychiatry*, *61*, Suppl 7, 14-21.
- Yehuda, R., Daskalakis, N.P., Desarnaud, F., Makotkine, I., Lehrner, A.L., Koch, E., . . . Bierer, L.M. (2013). Epigenetic biomarkers as predictors and correlates of symptom improvement following psychotherapy in combat veterans with PTSD. *Frontiers in psychiatry*, *4*, 118.
- Zaboli, G., Gizatullin, R., Nilsonne, A., Wilczek, A., Jönsson, E.G., Ahnemark, E., . . . Leopardi, R. (2006). Tryptophan hydroxylase-1 gene variants associate with a group of suicidal borderline women. *Neuropsychopharmacology*, *31*, 1982-1990.
- Zaheer, J., Links, P. S., & Liu, E. (2008). Assessment and emergency management of suicidality in personality disorders. *The psychiatric clinics of North America*, *31*, 527-543.
- Zanarini, M.C. (2000). Childhood experiences associated with the development of borderline personality disorder. *The psychiatric clinics of North America*, *23*, 89-101.
- Zanarini, M.C., & Frankenburg, F.R. (1997). Pathways to the development of borderline personality disorder. *Journal of personality disorders*, *11*, 93-104.
- Zanarini, M. C., Frankenburg, F. R., Hennen, J., Reich, D. B., & Silk, K. R. (2006a). Prediction of the 10-year course of borderline personality disorder. *The American journal of psychiatry*, *163*, 827-832.
- Zanarini, M.C., Frankenburg, F.R., Reich, D.B., & Fitzmaurice, G. (2012). Attainment and stability of sustained symptomatic remission and recovery among patients with borderline personality disorder and axis II comparison subjects: A 16-year prospective follow-up study. *The American journal of psychiatry*, *169*, 476-483.
- Zanarini, M. C., Frankenburg, F. R., Ridolfi, M. E., Jager-Hyman, S., Hennen, J., & Gunderson, J. G. (2006b). Reported childhood onset of self-mutilation among borderline patients. *Journal of personality disorders*, *20*, 9-15.
- Zanarini, M.C., Gunderson, J.G., Marino, M.F., Schwartz, E.O., & Frankenburg, F.R. (1988). DSM-III disorders in the families of borderline outpatients. *Journal of personality disorders*, *2*, 292-302.
- Zanarini, M.C., Yong, L., Frankenburg, F.R., Hennen, J., Reich, D.B., Marino, M.F., & Vujanovic, A.A. (2002). Severity of reported childhood sexual abuse and its relationship to severity of borderline psychopathology and psychosocial impairment among borderline inpatients. *The journal of nervous and mental disease*, *190*, 381-387.
- Zeilinger, S., Kühnel, B., Klopp, N., Baurecht, H., Kleinschmidt, A., Gieger, C., . . . Illig, T. (2013). Tobacco smoking leads to extensive genome-wide changes in DNA methylation. *PLoS One*, *8*, e63812.
- Zetzsche, T., Preuss, U.W., Bondy, B., Frodl, T., Zill, P., Schmitt, G., . . . Meisenzahl, E.M. (2008). 5-HT1A receptor gene C -1019 G polymorphism and amygdala volume in borderline personality disorder. *Genes, brain, and behavior*, *7*, 306-313.
- Zhou, Y., Wang, J., He, Y., Zhou, J., Xi, Q., Song, X., . . . Ying, B. (2015). Association between dopamine beta-hydroxylase 19-bp insertion/deletion polymorphism and major depressive disorder. *Journal of molecular neuroscience*, *55*, 367-371.
- Zimmerman, D.J., & Choi-Kain, L.W. (2009). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in borderline personality disorder: A review. *Harvard review of psychiatry*, *17*, 167-183.
- Zuckerman, M. (1991). *Psychobiology of personality*. New York: Cambridge University Press.
- Zuckerman, M. (2002). Zuckerman-Kuhlman personality questionnaire (ZKPQ): An alternative five-factorial model. En B. De Raad, & M. Perugini (Eds.), *Big five assessment* (pp. 377-396). Seattle, WA: Hogrefe and Huber Publishers.



