

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

**Evidência de efeito de dimorfismo sexual do gene do receptor de serotonina do tipo 1B: Um estudo do TDAH em adultos e suas principais comorbidades**

**Diana Müller**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Dr. Claiton Henrique Dotto Bau  
Coorientadora: Dra. Jaqueline Bohrer Schuch

Porto Alegre, março de 2017.

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

**Instituições Financiadoras:**

CNPq - Conselho Nacional de Pesquisa.

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

FAPERGS - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul.

DECIT - Departamento de Ciência e Tecnologia.

PPSUS - Programa Pesquisa para o SUS.

## **Agradecimentos**

Academicamente gostaria de agradecer em primeiro lugar ao meu orientador professor Claiton, que me acolheu no seu grupo de pesquisa, e à minha coorientadora Jaqueline, que me acompanhou desde minha iniciação científica até aqui. Também tenho a agradecer a toda a turma da sala 109, Alana, Angelita, Bruna, Cibele, Cristina, Diego, Djenifer, Lauren e de forma especial à Renata, que me deu bastante apoio durante minha adaptação à dinâmica do grupo. Nesta parte também não poderia deixar de agradecer à Gláucia, por além das conversas sobre tópicos científicos ter se tornado minha amiga.

Dentre minhas amizades tenho muito a agradecer. Em especial à Leslie e ao Albert, que me fizeram expandir ideologicamente/politicamente e que rapidamente me ajudaram a construir um lugar muito especial da minha vida, além do que boa parte desta dissertação foi escrita em sua casa. Também agradeço à Nina, que entrou comigo na graduação e se mostrou ser uma grande amiga e boa conselheira.

Agradeço imensamente à minha mãe por ter me apoiado (e cobrado) muito. Ao meu pai, que apesar de ter tido uma vida difícil acabou por compreender meu desejo de estudar. À minha vó Vilma, que mesmo sendo tão “durona” sempre dedicou amor incondicional a mim e ao meu irmão. À Laurinha, por ter feito vários finais de semana mais vivos.

Não poderia deixar de agradecer às políticas adotadas por Luís Inácio Lula da Silva e Dilma Vana Rousseff, as quais possibilitaram que as portas das Universidades Públicas se abrissem para as filhas e filhos da classe trabalhadora e que lá pudéssemos permanecer até o fim da graduação. Sem tais medidas o sonho de ser bióloga teria sido apenas uma utopia, e ainda mais o de fazer uma pós-graduação.

Por último, agradeço ao Lucas, por ser meu melhor amigo e meu porto seguro. Teu companheirismo é inestimável, só por intermédio dele pude acreditar um pouco mais em mim mesma e superar os diversos obstáculos que surgiram até aqui e me tornaram a pessoa que sou. Sem dúvidas meu maior agradecimento é a essa parceria.

## Sumário

<b>Lista de abreviaturas</b> .....	5
<b>Resumo</b> .....	6
<b>Abstract</b> .....	7
<b>Capítulo 1 Introdução</b> .....	8
1.1 O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) .....	9
1.2 A base neurobiológica do TDAH .....	12
1.3 A genética do TDAH .....	14
1.4 Sistema serotoninérgico e seus genes .....	16
1.5 O receptor de serotonina do tipo 1B – <i>HTR1B</i> .....	18
1.6 Efeito de gênero .....	21
<b>Capítulo 2 Justificativa e objetivos</b> .....	23
2.1 Justificativa .....	24
2.2 Objetivos .....	25
2.2.1 Objetivos gerais .....	25
2.2.2 Objetivos específicos .....	25
<b>Capítulo 3 Manuscrito em preparação</b> .....	26
<b>Capítulo 4 Discussão geral</b> .....	54
<b>Bibliografia</b> .....	58
<b>Anexos</b> .....	71
Aprovação do comitê de ética do HCPA .....	72

## Lista de abreviaturas

*DAT* – Transportador de Dopamina

*DAT-KO* – Nocaute do Transportador de Dopamina

*DRD4* – Gene do Receptor de Dopamina do tipo 4

*DRD5* – Gene do Receptor de Dopamina do tipo 5

DSM – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

GWAS - Estudo de Associação por Varredura Genômica

*HTR1A* – Gene do Receptor de Serotonina do tipo 1A

*HTR1B* – Gene do Receptor de Serotonina do tipo 1B

*HTR2A* – Gene do Receptor de Serotonina do tipo 2A

*HTR2C* – Gene do Receptor de Serotonina do tipo 2C

5-HT1B – Proteína receptora de serotonina do tipo 1B

*MAO A* – Gene da Monoamina oxidase A

MPH - Metilfenidato

PGC - *Psychiatric Genomics Consortium*

*SLC6A4* – Gene do Transportador de Serotonina

SNARE - Soluble NSF (N-ethylmaleimide-Sensitive Fusion) *Attachment*

*Protein Receptors*

SNP - Polimorfismo de Nucleotídeo Único

*SRY* – Região de determinação sexual do cromossomo Y

TDAH - Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade

3'UTR – Região 3' não traduzida

## Resumo

O transtorno de déficit de atenção/hiperatividade (TDAH) é um transtorno prevalente tanto em crianças quanto em adultos, estando relacionado com uma ampla gama de prejuízos. Além disso, o TDAH apresenta uma alta prevalência de uma série de comorbidades, as quais contribuem para a sua grande heterogeneidade clínica. Tais comorbidades apresentam uma distribuição diferenciada de acordo com o sexo, com homens apresentando mais frequentemente transtornos externalizantes, enquanto mulheres têm uma prevalência aumentada dos fenótipos internalizantes – o que constitui uma evidência de dimorfismo sexual. Genes do sistema serotoninérgico já foram associados com diversos transtornos psiquiátricos, inclusive com TDAH, além de também apresentarem evidências de influências em dimorfismo sexual. Dos diversos genes serotoninérgicos analisados, o *HTR1B* destaca-se por apresentar maior consistência nos diversos estudos, o que foi apoiado por uma meta-análise. Dessa forma, investigamos o efeito das variantes rs11568817, rs130058, rs6296 e rs13212041 do gene *HTR1B* sob o TDAH em adultos e sob suas principais comorbidades, separadamente por sexo. Não foram observados efeitos dos SNPs estudados diretamente sobre o TDAH. Contudo, em homens, o rs130058 – alelo T foi associado ao transtorno por uso de substâncias. Já em mulheres, verificou-se um efeito protetivo do rs6296 – alelo C em relação ao transtorno de ansiedade generalizada. Quanto ao rs11568817 – alelo G houve associações com os transtornos por uso de substâncias e dependência de nicotina em homens e com transtorno de ansiedade generalizada em mulheres. Nossos resultados acerca deste último polimorfismo sugerem um interessante efeito de dimorfismo sexual quanto ao gene *HTR1B*. No presente trabalho reforçamos a contribuição de SNPs do *HTR1B* em diferentes transtornos psiquiátricos, apoiando a necessidade de análises em grupos mais homogêneos, separados por sexo. Este tipo de abordagem pode aumentar o poder de identificação de fatores genéticos implicados nos diferentes transtornos.

## Abstract

Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder is a highly prevalent disorder both in children and adults and is associated with a broad spectrum of impairments. Besides that, the disorder shows a high prevalence of comorbidities which contribute to high clinic heterogeneity of the disorder. These comorbidities show a differential prevalence according to sex, in which men are more frequently affected by externalizing disorders while women by internalizing ones – which is an evidence of sexual dimorphism. Genes of serotonergic system were associated with several psychiatric disorders, including ADHD, and also show evidence of to influence sexual dimorphism effect. Among serotonergic genes, *HTR1B* is the receptor with most consistent evidence of association according to a meta-analysis. In this way, we analyzed the effect of rs11568817, rs130058, rs6296 and rs13212041 variants of *HTR1B* in relation to ADHD in adults and to its major comorbidities, separately by sex. No association was found between the SNPs tested and adults with ADHD. Otherwise, in men the rs130058 – T allele shows association with substance use disorder. In the other hand, in women we found a protective effect of rs6296 – C allele with generalized anxiety disorder. Concerning rs11568817 – G allele, there were associations with substance use disorder and nicotine dependence in men and with generalized anxiety disorder in women. Our findings about this last polymorphism suggest an interesting sexual dimorphic effect of *HTR1B* gene. In the present study, we confirm the contribution of *HTR1B* variants to several psychiatric disorders, supporting the necessity of analyses of more homogenous groups, separately by sex. This approach could increase the power of identifying genetic factors involved in different disorders.





## **1. O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH)**

O TDAH, conforme a quinta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais (DSM-5), é um transtorno do neurodesenvolvimento caracterizado por déficits relacionados a atenção, organização, e/ou hiperatividade-impulsividade (APA, 2013). A persistência deste padrão de sintomas resulta em prejuízos nos âmbitos pessoal, social, acadêmico ou de funcionamento ocupacional. Por muito tempo o TDAH foi considerado um transtorno de início precoce, ainda na infância, e com efeito limitado na população adulta. Porém, essa perspectiva foi se alterando e atualmente sabe-se que o TDAH persiste até a vida adulta em torno de 50% dos casos infantis (Lara et al. 2009). Além disso, estudos recentes de coortes demonstraram uma falta de sobreposição entre os grupos de indivíduos que apresentam TDAH na infância e aquele que o manifesta na vida adulta, sugerindo a hipótese de que o início precoce ou tardio do transtorno seja na verdade reflexo de dois mecanismos etiológicos distintos (Moffitt et al. 2015; Caye et al. 2016).

Apesar dos avanços na compreensão de componentes neurobiológicos associados ao transtorno, o diagnóstico de TDAH permanece fundamentado em critérios clínicos. Os sintomas relacionados ao transtorno são divididos no DSM-5 em dois blocos, contendo 9 sintomas cada, sendo um bloco de desatenção e outro de hiperatividade/impulsividade (tabela 1). O diagnóstico em adultos envolve a presença de pelo menos cinco sintomas, em pelo menos um dos blocos. O preenchimento de outros critérios deve ser contemplado para o diagnóstico, como manifestação dos sintomas antes dos 12 anos de idade, e em mais de um contexto (em casa, na faculdade, no trabalho, nas relações sociais), associados ao prejuízo no desempenho do indivíduo. Além disso, os sintomas não podem ser melhor explicados por outro transtorno psiquiátrico (APA, 2013). Estima-se que a prevalência do TDAH em crianças em idade escolar esteja em torno de 5,9 – 7,1%, enquanto que em adultos esteja entre 2,5 – 5% (Fayyad et al. 2007; Simon et al. 2009; Willcutt 2012). Enquanto que em amostras clínicas de crianças se encontra uma taxa de TDAH na proporção de 3:1 a 9:1 meninos em relação a meninas, em adultos esta distribuição se torna mais homogênea (Faraone et al. 2006; Matte et al. 2015). Uma possível explicação

**Tabela 1:** Sintomas utilizados no diagnóstico do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade dentro dos blocos de desatenção e de hiperatividade/impulsividade.

Desatenção	Hiperatividade/Impulsividade
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dificuldade em prestar atenção a detalhes</li> <li>• Dificuldade em manter atenção durante tarefas</li> <li>• Frequentemente parece não estar ouvindo</li> <li>• Dificuldade em seguir instruções e terminar tarefas</li> <li>• Dificuldade em organizar tarefas e atividades</li> <li>• Evita se envolver em atividades que necessitem esforço mental sustentado</li> <li>• Com frequência perde materiais necessários às tarefas e atividades</li> <li>• Se distrai facilmente com estímulos externos</li> <li>• Frequentemente se esquece de atividades diárias</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• É inquieto com as mãos e pés quando sentado</li> <li>• Com frequência deixa seu assento em situações em que se espera que fique sentado</li> <li>• Frequentemente sente inquietude</li> <li>• Dificuldade de desempenhar atividades de lazer quietamente</li> <li>• Parece estar sempre com o motor ligado</li> <li>• Frequentemente apresenta fala excessiva</li> <li>• Com frequência responde a perguntas antes de que as mesmas sejam finalizadas</li> <li>• Dificuldade em esperar pela sua vez</li> <li>• Frequentemente interrompe aos outros</li> </ul>

para essa mudança ao longo do desenvolvimento é a de que os pais e professores são os responsáveis pelo encaminhamento das crianças aos consultórios, enquanto que na vida adulta os próprios indivíduos buscam a assistência médica. Isso é possivelmente devido ao fato de que os meninos apresentam mais frequentemente comportamentos de caráter hiperativo/impulsivo (comportamentos externalizantes) e, por consequência, mais precocemente diagnosticados em relação a contraparte das meninas, as quais são preponderantemente desatentas (fenótipo internalizante) (Rucklidge, 2010). Assim, há a possibilidade de que na realidade as taxas na infância sejam semelhantes em ambos os sexos, e a aparente disparidade entre as frequências esteja relacionada a uma menor percepção da gravidade pelos pais e professores e consequente menor frequência de diagnóstico formal nos casos envolvendo meninas (Rucklidge, 2010). Esta patologia está entre os transtornos psiquiátricos mais comuns

da infância e da vida adulta (Barkley et al. 2006; Kessler et al. 2006). Como consequência, tanto crianças quanto adultos com TDAH, apresentam um amplo espectro de prejuízos. No período da infância e adolescência se observa, por exemplo, um aumento no risco de apresentar repetência escolar, expulsões, problemas de conduta e delinquência, além de abuso de drogas (Rohde and Halpern 2004). Já em indivíduos adultos se destacam os prejuízos no entendimento e aproveitamento das informações, dificuldades com organização e administração do tempo (Wilens and Dodson, 2004). Além de trocarem de emprego mais frequentemente, os adultos afetados apresentam mais dificuldades no trabalho, maiores taxas de separação/divórcio e mais problemas no trânsito, além de risco aumentado de morte (Barkley et al. 2002; Wilens et al. 2004; Dalsgaard et al. 2015).

Indivíduos com TDAH frequentemente apresentam maior prevalência de algum outro transtorno psiquiátrico ao longo da vida (66,2 – 77,1%), comparado com a população em geral (45,7%) ( Sobanski et al. 2007; Piñero-Diequez et al. 2016). Dentre as comorbidades mais comuns estão os transtornos por uso de substâncias (39,2%), os transtornos de ansiedade (23%), e os transtornos de humor (18,1%) (Garcia et al. 2012; Kessler et al. 2006; Piñero-Diequez et al. 2016). Aproximadamente de 35 a 50% dos pacientes adultos com TDAH referiram sintomas depressivos, depressão recorrente ou desenvolveram episódios depressivos completos (Sobanski et al. 2007; Kooij et al. 2012). Essa diversidade de transtornos que podem se apresentar em comorbidade com o TDAH contribuem para a heterogeneidade clínica do mesmo (Steinhausen 2009; Franke et al. 2011).

Como mencionado anteriormente, os diferentes transtornos psiquiátricos podem ser classificados como externalizantes ou internalizantes. Assim, aqueles transtornos que apresentam sintomatologia mais claramente relacionada ao ambiente exterior ao próprio indivíduo são agrupados no grupo de externalizantes. Por sua vez, os transtornos internalizantes se caracterizam por manifestarem seus efeitos, de forma mais contundente, no próprio indivíduo (Achenbach et al. 1991). Com base nesta classificação é possível notar uma prevalência diferenciada das principais comorbidades com o TDAH de acordo com o sexo. Dessa maneira, temos que

mulheres são frequentemente mais afetadas pelos transtornos comportamentais internalizantes - em especial depressão, ansiedade, transtornos alimentares e de sono (Sobanski et al. 2007; Rasmussen and Levander 2009), enquanto os homens apresentam, mais comumente, fenótipos externalizantes – como transtornos por uso de substâncias, de personalidade antissocial e de conduta (Biederman et al. 2004; Seedat et al. 2009).

## **2. A base neurobiológica do TDAH**

Estudos de neuroimagem funcional e estrutural têm contribuído no esclarecimento da origem neurobiológica do TDAH. Diversos estudos e revisões foram conduzidos nesta área, contudo a exata compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos na etiologia do transtorno ainda carece de maiores explicações (em parte devida à falta de homogeneidade nas populações estudadas e ao diagnóstico que pode compreender outros transtornos comórbidos – podendo apresentar diferentes etiologias) (Spencer, Biederman, and Mick 2007; Tripp and Wickens 2009). Pelo menos dois trabalhos de revisão de neuroimagem no TDAH sugerem o envolvimento de alterações no desenvolvimento das redes cerebrais relacionadas a cognição, atenção, emoção, funções sensoriais e motoras, além de função executiva e de motivação/recompensa (Cortese, 2012; De La Fuente et al. 2013). O TDAH tem se manifestado como uma doença fronto-estriato-cerebelar, visto que pacientes apresentam uma diminuição tanto no volume quanto na atividade destas regiões (Curatolo et al. 2009; Makris et al. 2009; Curatolo, Agati, and Moavero 2010). Porém, as diferenças em volume parecem ser restritas às amostras infantis (Hoogman et al. 2017). Em concordância com tais achados, estudos neuropsicológicos demonstraram que o desempenho de crianças com TDAH foi prejudicado em funções cognitivas e executivas tais como atenção, planejamento, organização e também falhas na inibição comportamental, as quais são funções relacionadas ao lobo frontal e áreas subcorticais (Arnsten and Li 2005; Nigg, 2005; Makris et al. 2009). De qualquer forma, dados de mega-análises apontam para o TDAH, tanto em crianças quanto em adultos, como uma patologia com base em alterações cerebrais (Hoogman et al. 2017).

Tomando-se as regiões primariamente implicadas nesta doença, os estudos bioquímicos foram iniciados com foco nos neurotransmissores predominantes em tais áreas. Assim, as primeiras teorias partiram do estudo das catecolaminas, principalmente a dopamina (Arnsten and Li 2005; Curatolo et al. 2009, 2010). Déficits desse neurotransmissor nas regiões corticais e do estriado em estudos com animais favoreceram a hipótese dopaminérgica. Estudos farmacológicos reforçaram essa hipótese uma vez que o principal medicamento utilizado (metilfenidato – MPH) atua neste sistema (Swanson and Volkow 2003). A ação do MPH ocorre por intermédio do bloqueio da proteína transportadora de dopamina, localizada no neurônio pré-sináptico, impossibilitando a recaptação de tal neurotransmissor (Masellis et al. 2002; Madras, Miller, and Fischman 2005; Swanson et al. 2007). Desta forma, os níveis dopaminérgicos se tornam elevados na fenda sináptica amplificando a resposta relacionada a sua ligação com seus receptores, sendo este um provável mecanismo de efeito terapêutico do fármaco (Volkow et al. 2001; Shafritz et al. 2004; Swanson et al. 2007).

Posteriormente, outros sistemas de neurotransmissão foram também implicados no TDAH, como o noradrenérgico, o serotoninérgico e o gabaérgico (Quist and Kennedy 2001; Edden et al. 2012; Sterley, Howells, and Russell 2013). A teoria serotoninérgica foi proposta a partir de evidências do seu envolvimento em transtornos que, assim como o TDAH, também seriam caracterizados por déficits na inibição comportamental (capacidade de inibir estímulos inapropriados a um dado contexto) (Crockett et al. 2009) que se refletem em diversas patologias, tais como abuso de álcool, transtorno de personalidade antissocial, transtorno de conduta, agressão, suicídio e bulimia (Brunner and Hen 1997; Lucki 1998; Quist and Kennedy 2001). A desinibição comportamental está relacionada com características impulsivas (inclinação a preferir pequenas recompensas imediatas em detrimento de uma maior recompensa que seja precedida por um momento de espera – entendida pelo indivíduo como atraso) (Dalley and Roiser, 2012). De fato, houve trabalhos que sugeriram o nível de serotonina como um possível marcador biológico de comportamento impulsivo (Coleman 1971; Saul and Ashby 1986; Spivak et al. 1999). Essa hipótese também foi

apoiada por achados da influência do receptor de serotonina 1B (5-HT<sub>1B</sub>) sobre a resposta ao tratamento com metilfenidato e de seu efeito modulando os níveis dopaminérgicos em animais nocaute para o gene da proteína transportadora da dopamina (DAT-KO) (Gainetdinov et al. 1999; Quist and Kennedy 2001).

### **3. A genética do TDAH**

À semelhança de outros transtornos psiquiátricos, o TDAH tem uma etiologia multifatorial, na qual vários genes de pequeno efeito são responsáveis pela vulnerabilidade genética ao problema, somados a um importante componente ambiental. Estudos de gêmeos e famílias têm destacado o papel dos fatores genéticos neste transtorno (Mick and Faraone 2008; Brikell et al. 2015), com uma herdabilidade estimada em 70 - 80% tanto em crianças quanto em adultos (Smoller et al. 2006; Mick and Faraone 2008; Chang et al. 2013; Merwood et al. 2013). No que tange à busca pelo entendimento mais detalhado da etiologia, a grande heterogeneidade do TDAH acrescenta mais um nível de complexidade (Smoller et al. 2006; Franke et al. 2011).

Uma vez que fatores genéticos podem ser considerados como os principais componentes de risco ao TDAH, muitos estudos têm sido conduzidos na tentativa de revelar genes potencialmente associados com esta condição. Uma das abordagens utilizadas na investigação de variantes genéticas associadas a determinadas doenças envolve a pesquisa de variantes comuns ao longo do genoma, também denominada de varredura genômica (do inglês *genome wide association study* ou GWAS). Este tipo de estudo não leva em consideração hipóteses prévias, contudo uma limitação desta técnica diz respeito a dificuldade em se alcançar tamanhos amostrais que permitam detectar tanto o pequeno efeito dos SNPs individuais (Rietveld et al. 2014) quanto de que as associações se revelem de fato significativas após a correção para o enorme número de SNPs testados – atualmente na ordem de milhões, sendo que o valor de P para uma associação ser considerada significativa é estimado em menos do que 10<sup>-8</sup>. Visto que grupos de pesquisa individuais dificilmente alcançariam tal escala de tamanho amostral, é comum que diferentes centros, muitas vezes espalhados pelo mundo, se unam em consórcios na tentativa de contornar tal dificuldade. Uma amostra

disso é o resultado preliminar de um estudo realizado pelo PGC (*Psychiatric Genomics Consortium*). Foi realizada uma meta-análise que envolveu 18.000 pacientes com TDAH e 35.000 indivíduos de comparação, e assim foi possível detectar 10 loci associados com o TDAH (Zai et al. 2016). Estudos prévios, com tamanho amostral inferior, não haviam encontrado qualquer associação significativa (Neale et al. 2010).

Embora as varreduras genômicas sejam a abordagem mais priorizada pelos grandes consórcios da atualidade, os estudos de gene candidato, pioneiros na área, ainda são uma abordagem válida principalmente por tolerarem um tamanho amostral reduzido, e assim viabilizarem análises em temas que envolvem heterogeneidade (como no caso do TDAH) ou estudos com delineamento mais complexo, como no caso da farmacogenética. Esta modalidade leva em consideração hipóteses previamente elaboradas acerca da contribuição de algum gene nos mecanismos de saúde/doença. Neste âmbito, os genes do sistema dopaminérgico têm sido os mais estudados, o que é condizente com o fato do sistema dopaminérgico ter sido um alvo pioneiro, como mencionado anteriormente. Uma meta-análise de estudos de associação detectou diversos achados positivos para uma série de genes desta via, como por exemplo o transportador de dopamina (*DAT*) e os receptores de dopamina do tipo D4 (*DRD4*) e do tipo D5 (*DRD5*) (Gizer et al. 2009). Porém, mesmo quando tomados em conjunto estes genes, juntamente com outros do mesmo sistema, muito pouco da contribuição genética é explicada. A partir de um estudo feito em 1999 com camundongos nocaute *DAT-KO* (e, por consequência, hiperativos), verificou-se que o efeito calmante do metilfenidato foi dependente da neurotransmissão serotoninérgica, visto que os níveis dopaminérgicos não se alteraram nos animais mutantes (Gainetdinov et al. 1999). No mesmo estudo, a utilização de fluoxetina (um inibidor seletivo da recaptação de serotonina) também foi capaz de reduzir a atividade dos camundongos *DAT-KO*, enquanto não resultou em alteração nos animais selvagens. Concluiu-se que o efeito observado foi consequência do aumento da concentração de serotonina extracelular, devido ao bloqueio do transportador de serotonina. Além disso, a administração do precursor de serotonina (L-triptofano) reduziu a hiperlocomoção nos animais com a mutação. A administração do agonista RU24969 do receptor de serotonina do tipo 1B

(5-HT1B) indicou que sua ativação pode resultar em aumento na ansiedade e na locomoção.

A partir de então, estudos considerando genes do sistema serotoninérgico na etiologia do TDAH e transtornos comórbidos começaram a ser realizados (Hawi et al. 2002; Quist and Kennedy 2001).

#### **4. Sistema serotoninérgico e seus genes**

O sistema serotoninérgico, além da própria serotonina, compreende o transportador de serotonina (*SLC6A4* (*5-HTT* ou *SERT*) – 17q11) e seus diferentes receptores. Tais receptores estão divididos em 7 classes principais (5-HT1 – 5-HT7), com a classe 5-HT1 sendo ainda subdividida nas subclasses A, D, E e F. O grupo 5-HT1D é separado em  $\alpha$  e  $\beta$ , sendo que o gene *HTR1D $\beta$*  humano possui mais homologia com o gene *HTR1B* de roedores do que com o gene *HTR1D $\alpha$*  (1p36) humano (Mochizuki et al. 1992). Desta forma, esse receptor é chamado de HTR1B (5-HT1B) tanto em humanos quanto em ratos (Hartig et al. 1996). Os receptores 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT2C e 5-HT2A (codificados respectivamente pelos genes *HTR1A* (5q12), *HTR1B* (6q13), *HTR2C* (Xq23) e *HTR2A* (13q14)) são proteínas de subunidade única que fazem parte da superfamília de receptores acoplados a proteína G. Essa característica, de interação com proteína G, permite que estes receptores modulem a atividade de diferentes sistemas efetores, tais como canais de íon, fosfolipase C e adenilato ciclase (Frazer and Hensler, 1999). Assim, não é surpreendente a constatação de que estes receptores estejam envolvidos em uma infinidade de condições, sejam elas psiquiátricas ou não.

Outros estudos, em modelo animal, sugeriram o envolvimento de receptores serotoninérgicos específicos nos comportamentos impulsivo e hiperativos. Verificou-se, em camundongos DAT-KO, que também eram heterozigotos nocaute para o gene *HTR1B*, que a administração de antagonistas farmacológicos do receptor do tipo 1B atenuava a hiperatividade locomotora característica dos animais DAT-KO (Hall et al. 2014). O mesmo estudo também indicou que os camundongos heterozigotos nocaute do gene *HTR1B* recuperavam a atividade de locomoção por estímulo de cocaína,



sendo que esse efeito não foi verificado nos camundongos que apresentavam expressão normal do receptor 5-HT1B. Previamente, Kapur e Remington já haviam compilado dados de diversos trabalhos e concluíram que os receptores de serotonina *HTR1A*, *HTR1B* e *HTR2A* mediavam a regulação da serotonina sobre a dopamina (Kapur and Remington 1996). Camundongos nocaute para o 5-HT1B apresentaram maior consumo de álcool e de cocaína, além de aumento do comportamento hiperativo e agressivo (Brunner and Hen 1997; Huang et al. 1999). Saudou e colaboradores também trabalharam com modelo nocaute para o mesmo gene, porém também administraram agonistas da 5-HT1B. Tal abordagem resultou em estímulo da atividade motora nos animais “selvagens” e nenhuma alteração nos animais mutantes, levando a conclusão de que o efeito de hiperlocomoção foi mediado pelos receptores de serotonina 5-HT1B (Saudou et al. 1994).

De fato, o sistema serotoninérgico já tem sido estudado quanto aos níveis de serotonina no sangue de crianças hiperativas e com TDAH – sendo reduzidos nestes indivíduos quando comparados a crianças controles (Coleman 1971; Saul and Ashby 1986; Spivak et al. 1999). Também houve estudos de associação de genes serotoninérgicos no TDAH tanto em crianças (Manor et al. 2001; Hawi et al. 2002; Kent et al. 2002; Paula et al. 2006; Quist et al. 2003; Guimarães et al. 2009) quanto em adultos (Retz et al. 2002; Ribasés et al. 2009), porém com resultados algumas vezes contraditórios. O polimorfismo da região promotora do gene *SLC6A4*, 5-HTTLPR, foi descrito em termos de uma variante curta de 14 repetições (S) e outra longa de 16 repetições (L), que por sua vez apresenta um SNP, o rs25531 (L<sub>A</sub> e L<sub>G</sub>) (Lesch et al. 1996; Parsey et al. 2006). Houve trabalhos que apontaram uma associação do alelo L com TDAH (Manor et al. 2001; Retz et al. 2002; Zoroglu et al. 2002), mas também ocorreram relatos negativos (Banerjee et al. 2006; Heiser et al. 2007; Xu et al. 2008) e até mesmo de associação com o alelo S (Li et al. 2007). Também foram realizadas análises acerca dos receptores de serotonina, sendo que os achados mais relevantes foram os relativos aos polimorfismos dos genes *HTR2A* e *HTR1B* (Banerjee and Nandagopal 2015). Ao se considerar estudos de meta-análise temos que tanto o gene *SCL6A4* quanto o gene *HTR1B* têm apresentado resultados mais consistentes (Gizer

et al. 2009). No presente trabalho focamos na análise do papel de polimorfismos do *HTR1B* tanto no TDAH em adultos em si, quanto em comorbidades que são altamente prevalentes neste grupo de indivíduos.

### **5. O receptor de serotonina do tipo 1B - *HTR1B***

A proteína 5-HT<sub>1B</sub> consiste de 390 aminoácidos sendo expressa em uma série de regiões cerebrais (Sari, 2004). Dessa forma, este receptor de serotonina pode alterar o funcionamento dopaminérgico e de outros neurotransmissores por atuar tanto em neurônios pré-sinápticos como autoreceptor, quanto pós-sinápticos como heteroreceptor (Engel et al. 1986; Maura and Raiteri 1986; Barnes and Sharp 1999). Assim, por exemplo, alguns fenótipos que eram creditados a alterações dopaminérgicas ou gabaérgicas podem na verdade ser reflexo de uma resposta serotoninérgica (Barnes and Sharp 1999).

O gene do receptor de serotonina do tipo 1B (*HTR1B*) está localizado no cromossomo 6q13 (Jin et al. 1992) e tem sido implicado em diversas condições psiquiátricas, como comportamentos agressivos, impulsivos, hiperativos de abuso de substâncias, e de ansiedade (Brunner and Hen 1997; Huang et al. 2003; Conner et al. 2010). Estas condições são comorbidades altamente prevalentes em indivíduos com TDAH (Kessler et al. 2006). Ainda, estudos com esse gene na nossa população já relataram uma associação tanto à dependência de álcool (Contini et al. 2012) como ao TDAH em crianças (Guimarães et al. 2009).

Hawi e colaboradores (2002) foram os primeiros a avaliar uma variante do *HTR1B* como fator de predisposição ao TDAH. Pela análise de 273 famílias, foi verificada uma transmissão preferencial do alelo G do polimorfismo rs6296 às crianças afetadas. Estudos subsequentes foram realizados com esse mesmo polimorfismo, obtendo tanto achados positivos (Quist et al. 2003; Smoller et al. 2006) quanto negativos (Li et al. 2005; Mill et al. 2005; Brookes et al. 2006; Heiser et al. 2007; Ickowicz et al. 2007; Fonseca et al. 2015). Tendo em vista a existência dos achados conflitantes acerca deste SNP, se supôs que aqueles estudos que encontraram associação do transtorno com o alelo G na verdade estavam detectando o efeito de

alguma variante em proximidade (Heiser et al. 2007). Porém, uma importante meta-análise publicada apontou o alelo G como de risco para o TDAH, o que valida a avaliação deste SNP em análises futuras (Gizer et al. 2009). Um estudo detectou que o alelo C do rs6296 foi associado com uma redução média de 20% no número de sítios de ligação do receptor 1B em 96 amostras cerebrais *post-mortem* (Huang et al. 1999). Contudo, esse achado pode não evidenciar um efeito de funcionalidade direta do rs6296.

Dessa forma, a inclusão de outros polimorfismos do *HTR1B* em estudos com TDAH e com fenótipos relacionados ocorreu posteriormente. Os SNPs da região promotora rs11568817 e rs130058 e o polimorfismo da região 3'UTR rs13212051 estão entre os mais estudados, condizente com o fato de terem estudos demonstrando sua funcionalidade. Em um trabalho envolvendo linhagem celular não neuronal, o alelo T do rs130058 apresentou maiores níveis de expressão em relação aos constructos com alelo A. Por outro lado, um estudo que utilizou linhagem neuronal para analisar o efeito funcional dos dois polimorfismos da região promotora (rs11568817 e rs130058) relatou um resultado diferente. Nele foi reportado que com relação ao haplótipo mais comum (rs11568817 T – rs130058 A) o haplótipo G – A apresentou uma taxa transcricional aumentada em 2,3 vezes, enquanto o haplótipo G – T apresentou nível transcricional semelhante ao haplótipo T – A (Duan et al. 2003). Desta forma, tem-se que o alelo T do rs130058 é capaz de anular o aumento de transcrição que o alelo G do rs11568817 confere. A diferença de expressão encontrada para o rs130058 pode ser em função do tipo de linhagem utilizada nos estudos. Já o efeito do SNP rs13212041 da região 3' UTR diz respeito a sua capacidade de desfazer o sítio de ligação para o microRNA miR-96, modulando a regulação sobre a expressão do gene (Jensen et al. 2009).

Em um primeiro momento, o rs11568817 foi avaliado em amostras com abuso/dependência de cocaína ou álcool (Cigler et al. 2001; Sinha, Cloninger, and Parsian 2003) ou fenótipos depressivos e de ansiedade, contudo não foram encontradas associações (Wang et al. 2009; Mekli et al. 2011). Posteriormente, foram descritos achados positivos tanto em uma amostra composta apenas por homens

alcoolistas na população brasileira (alelo G) (Contini et al. 2012) quanto com a pontuação média na escala de pensamentos suicidas em uma amostra de pacientes chineses com depressão maior (alelo T) (Wang et al. 2009). Na mesma direção, dados de meta-análise indicaram que em amostras europeias o alelo G estava implicado em risco para abuso de álcool, cocaína e heroína, porém associado a proteção em não europeus (Cao, LaRocque, and Li 2013). Aqui é importante destacar que os achados se apresentaram com alelos diferentes conforme a população estudada, tal como ocorreu no trabalho de Contini et al. (2012) e Wang et al. (2009), além da meta-análise de Cao et al. (2013).

Quanto ao rs130058, este foi analisado pela primeira vez em 2001 em um trabalho que envolvia abuso e dependência de cocaína ou álcool. Nesta primeira análise não foi encontrada associação com o desfecho (Cigler et al. 2001), tampouco em uma amostra de alcoolistas brasileiros (Contini et al. 2012). Porém, com o aumento no número de estudos, uma meta-análise com abuso de álcool, cocaína e heroína reportou associação do alelo T com os fenótipos analisados (Cao et al. 2013). Considerando fenótipos internalizantes, tal variante mostrou tanto achados negativos quanto positivos. Este SNP pareceu não conferir susceptibilidade em modificar escores de pensamento suicida em pacientes chineses com depressão maior (Wang et al. 2009). Porém, apresentou uma associação com aumento em tais escores conforme o tratamento usado em indivíduos adultos (T com paroxetina e A com outros antidepressivos). Outros resultados negativos dizem respeito à depressão em si (Tsai et al. 2004; Zhang et al. 2009) e com comportamento suicida relacionado ao alcoolismo e à depressão (Tsai et al. 2004; Zupanc et al. 2010).

Dados muitos escassos foram obtidos até o momento para o rs13212041. Indivíduos portadores do alelo mais frequente (A) do rs13212041 apresentaram uma expressão reduzida do receptor HTR1B (Jensen et al. 2009). Esse polimorfismo já foi implicado em comportamento agressivo, frequentemente associado com TDAH, porém tal efeito só foi identificado em homens (Conner et al. 2010).

Diferentes trabalhos têm demonstrado que os polimorfismos da região promotora (rs11568817, rs130058) e do único éxon (rs6296) estão em desequilíbrio

de ligação (Huang et al. 1999; Duan et al. 2003). Assim, uma análise haplotípica se mostra interessante. Em uma amostra brasileira de crianças com TDAH foi relatado um excesso de transmissão do haplótipo rs11568817 G – rs130058 T – rs6296 G (Guimarães et al. 2009). Dessa forma, os diferentes SNPs citados podem estar contribuindo para a susceptibilidade ao TDAH, assim como em diferentes fenótipos clínicos observados nesses indivíduos.

## **6. Efeito de sexo**

Um efeito que tem sido frequentemente subestimado é aquele que o dimorfismo sexual pode exercer sobre fenótipos psiquiátricos. O dimorfismo sexual diz respeito a diferenças existentes entre machos e fêmeas da mesma espécie, se aplicando também a espécie humana. Um fator que aponta para a existência deste efeito na psiquiatria é a prevalência diferenciada que uma série de transtornos apresenta com relação ao sexo. Por exemplo, transtornos depressivos e ansiedade são muito mais frequentes em mulheres do que em homens (Weissman et al. 1984; Kessler, 2003; Seedat et al. 2009; Schuch et al. 2014;) enquanto a prevalência de abuso de substâncias é mais prevalente em homens (Becker and Hu 2008).

Diferentes fatores contribuem para as diferenças biológicas descritas em homens e mulheres. Assim, efeitos dos hormônios sexuais, cromossomos sexuais, do ambiente cultural e, mais recentemente, do ambiente epigenético foram propostos como moduladores das diferenças sexuais no cérebro (Gobinath, Choleris, and Galea 2017; Ratnu, Emami, and Bredy 2017).

Existem receptores de andrógeno em algumas regiões cerebrais nos quais a testosterona atua de forma a influenciar a sobrevivência celular e conectividade anatômica (Mccarthy, 2009). Foi relatado que o estrógeno influencia diretamente o crescimento dos neuritos dos neurônios serotoninérgicos que expressam receptores de estrógeno ER $\alpha$  e ER $\beta$  (Lu et al. 2004) além de reduzir a densidade e capacidade de ligação dos receptores de serotonina no cérebro de ratos (Biegon and McEwen 1982). Quanto aos cromossomos sexuais, existem regiões não homólogas entre X e Y. O gene *SRY*, localizado no cromossomo Y, codifica um fator de transcrição que regula o

promotor da monoamina oxidase A (*MAO A*) (Wu et al. 2009). A *MAO A* é responsável pela desaminação oxidativa dos neurotransmissores monoaminérgicos, o que inclui a serotonina. Os fatores citados podem estar envolvidos nas diferenças tanto morfológicas quanto fisiológicas que podem levar a mudanças na interação com o ambiente (Mccarthy et al. 2012). Além disso, novas evidências propõem que a metilação do DNA também é um importante componente que molda a diferenciação sexual do cérebro (Nugent et al. 2015; Hodes et al. 2017).

Como mencionado anteriormente, a serotonina já foi implicada na etiologia de transtornos psiquiátricos. Além disso, também há evidência do efeito do sexo nos níveis de serotonina circundante no sangue (Weiss et al. 2005). Outros estudos, tanto com modelos animais quanto de prevalência diferencial dos fenótipos em humanos reforçam que o sistema serotoninérgico pode atuar diferencialmente de acordo com o gênero (Lu et al. 2004; Kunimura et al. 2015; Gressier et al. 2016). Nesse sentido, o mesmo genótipo do polimorfismo 5-HTTLPR (SS), localizado no gene do transportador de serotonina, foi associado com comportamentos internalizantes em mulheres, enquanto que em homens foi relacionado a um maior risco em manifestar comportamentos externalizantes (Gressier et al. 2016). Apesar deste interessante resultado, poucas investigações foram conduzidas no sentido de considerar o dimorfismo sexual no sistema serotoninérgico, em especial com relação aos receptores de serotonina (Ashare et al. 2013), onde apenas um estudo, até onde sabemos, detectou este efeito com relação ao *HTR1B*, porém sem apresentar uma discussão que abrangesse tal perspectiva (Conner et al. 2010). Revisões têm trazido evidências tanto observacionais quanto estatísticas de ganho de informação ao se explorar homens e mulheres como dois grupos diferentes de pacientes (Gobinath et al. 2017).



## **1. Justificativa**

O TDAH é um transtorno psiquiátrico comum em adultos e que está relacionado com uma maior predisposição a comportamentos que levam a uma ampla gama de prejuízos em diversas áreas. Apesar de possuir uma alta herdabilidade, o entendimento do papel de variantes genéticas específicas envolvidas no TDAH ainda permanece um desafio, visto que o transtorno se manifesta em um amplo espectro de apresentações e comorbidades, gerando heterogeneidade clínica e provável envolvimento de diferentes mecanismos neurobiológicos. Logo, uma análise que vise o foco em subgrupos mais homogêneos pode contribuir na busca por mecanismos/genes envolvidos nas diferentes manifestações do transtorno. Nesse sentido, a investigação de peculiaridades relacionadas ao sexo ainda é escassa, embora muitas evidências apontem para a existência de efeito de dimorfismo sexual notadamente envolvendo o sistema serotoninérgico.



## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Investigar a influência de polimorfismos do gene *HTR1B* sobre a predisposição genética ao TDAH em adultos, bem como sobre suas principais comorbidades.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar o potencial efeito dos polimorfismos rs11568817, rs130058, rs6296 e rs13212041 do gene *HTR1B* na susceptibilidade ao TDAH em adultos;
- Investigar a influência dos SNPs citados acima na susceptibilidade a comorbidades comuns observadas em homens e mulheres, levando em conta as evidências prévias envolvendo dimorfismo sexual.



## **Sexual dimorphic effects of *HTR1B* in the unraveling of the phenotypic heterogeneity of adult ADHD**

Diana Müller<sup>1,2</sup>, Eugenio H. Grevet<sup>2,3</sup>, Alana C. Panzenhagen<sup>1,2</sup>, Renata B. Cupertino<sup>1,2</sup>, Bruna S. da Silva<sup>1,2</sup>, Djenifer B. Kappel<sup>1,2</sup>, Nina R. Mota<sup>4</sup>, Paula B. Rocha<sup>2</sup>, Stefania P. Teche<sup>2</sup>, Eduardo S. Vitola<sup>2</sup>, Luis A. Rohde<sup>2,3</sup>, Verônica Contini<sup>5</sup>, Diego L. Rovaris<sup>1,2</sup>, Jaqueline B. Schuch<sup>1,2,a</sup>, Claiton H. D. Bau<sup>1,2,a,\*</sup>

### **Author affiliations:**

<sup>1</sup>Department of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup>ADHD Outpatient Program, Adult Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup>Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>4</sup>Department of Human Genetics, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands

<sup>5</sup>PPGBIOTEC - Postgraduate Program in Biotechnology, Centro Universitário Univates, Lajeado, Brazil

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

\*Correspondence to: Claiton H. D. Bau

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

claiton.bau@ufrgs.br (C.H.D. Bau)

**Abstract:**

Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is a very common disorder, both in children and in adults and frequently present comorbidities. Since it is a highly heritable disorder, several studies have been looking for genes involved in its etiology. One of the major caveats in this search is the phenotypic heterogeneity, partly attributable to the sexual dimorphic effects characteristic of psychiatric disorders. Since the serotonergic system has a well-known sexual dimorphic effect, we tested the influence of *HTR1B* SNPs (rs11568817, rs130058, rs6296 and rs13212041) on ADHD susceptibility and on its major comorbidities, considering sex differences. We performed a binary logistic regression analyses to assess the effect of each individual SNP on the susceptibility to ADHD and also performed the analysis of comorbidities according to sex, considering their differential prevalence of comorbidities. Correction for multiple comparisons was generated by 10.000 permutations. We found significant associations of both rs11568817 and rs130058 with substance use disorder (rs11568817,  $P_{\text{corr}} = 0.009$ ; rs130058,  $P_{\text{corr}} = 0.018$ ) and of rs11568817 with nicotine dependence (rs11568817,  $P_{\text{corr}} = 0.025$ ) in men. Among women, rs11568817 was associated with generalized anxiety disorder ( $P_{\text{corr}} = 0.031$ ). Other nominally significant findings were found in men and women subgroups. In this way, the overall scenario suggests that the higher *HTR1B* expression resulting from the presence of the rs11568817 G allele relates with externalizing behaviors in men and with internalizing behaviors in women. These results add evidence to the previously known sexual dimorphism of the serotonergic system.

**Key-words:** attention-deficit/hyperactivity disorder, serotonin, serotonin receptor 1B, sexual dimorphism, gene

## Introduction

Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is a neurodevelopmental disorder characterized by impairing levels of inattention, and/or hyperactivity-impulsivity according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – DSM-5 (APA, 2013). Despite the fact that ADHD has long been considered a childhood disorder, there is now evidence that it would either persist into adulthood life in a rate of ~65% (Faraone et al. 2006) or even emerge in this later period (Moffitt et al. 2015; Caye et al. 2016). Several studies have been looking for potentially associated genes, which is suitable with the high heritability observed for ADHD (~76%) (Brikell et al., 2015). In the last few years, genome wide association studies (GWAS) have been performed, yet they did not find any significant association with ADHD (Neale et al., 2010). However, preliminary GWAS meta-analysis results identified 10 associated loci (Zai et al., 2016). On the other hand, meta-analyses using the candidate gene approach showed significant associations (Bonvicini et al., 2016; Forero et al., 2009; Gizer et al., 2009; Pan et al., 2015; Ye et al., 2016) although high heterogeneity across studies was detected for the majority of genes (Gizer et al., 2009). Results from these studies highlight the importance of serotonergic genes on ADHD etiology (Bonvicini et al., 2016; Gizer et al., 2009).

The serotonergic system is related to neurotransmission in brain regions implicated in attention and motor activities (Tekin and Cummings, 2002). Serotonergic genes were associated with a range of psychiatric phenotypes such as substance use disorder (SUD) (Contini et al. 2012; Cao et al. 2013) and mood disorders (Martinowich and Lu, 2008). One of the few genes that showed significant association with ADHD was the serotonin receptor 1B gene (*HTR1B*) (Gizer et al., 2009). However, almost all ADHD studies were performed with children so far (Hawi et al. 2002; Quist et al. 2003; Li et al. 2005; Smoller et al. 2006; Brookes et al. 2006; Ickowicz et al. 2007; Heiser et al. 2007; Kim et al. 2007; Guimarães et al. 2009; Fonseca et al. 2015; Banerjee et al. 2012;). In adults with ADHD, there are only few studies investigating this gene in the susceptibility to the disorder (Ribasés et al., 2009), treatment response (Contini et al. 2012) and as a target for miRNA (Sánchez-Mora et al., 2013).

Individuals with ADHD often present comorbidities, such as mood disorders, anxiety disorders and SUD (Kessler et al. 2006; Garcia et al. 2012). Remarkably, in general population, men and women are differently affected by these psychiatric disorders (Rucklidge, 2010; Rucklidge et al., 2016). In this sense, women are more frequently affected by internalizing behaviors, especially depression, anxiety, eating disorders, and sleep problems (Sobanski et al. 2007; Rasmussen and Levander 2009). On the other hand, men are more frequently affected by externalizing phenotypes, such as SUD, antisocial personality disorder, and conduct disorder (Biederman et al., 2004; Seedat et al., 2009). Regarding brain differences in gender, some studies have demonstrated both hormonal variations and sex chromosomes can influence brain phenotypes (Davies and Wilkinson 2006; Zaidi 2010; Seney et al. 2013; Davies 2014). Furthermore, studies in animal models and on the prevalence of different phenotypes in humans suggested the serotonergic system could act differently according to gender (Lu et al., 2004; Kunimura et al., 2015; Gressier et al., 2016). For instance, the same allele (S) and genotype (SS) of serotonin transporter-linked polymorphic region (5-HTTLPR) were related to internalizing behaviors in women, while men showed increased risk to externalizing behaviors (Gressier et al., 2016). Despite this result, sexual dimorphism has been poorly investigated in serotonergic pathways, specially concerning serotonergic receptors (Ashare et al., 2013). Moreover, sexual dimorphism effect was also reported in ADHD considering prevalence, clinical course, comorbidities and underlying neural substrates (Rucklidge, 2010).

Emerging data have been pointing to an information gain when exploring men and women as two different groups (Gobinath et al., 2017). In this sense, Conner et al. (2010) have already described differential association of *HTR1B* haplotypes with anger and hostility, with an association within a men sample and no association in a subgroup of women. Interestingly, complex interpretations have been a hallmark of serotonergic system genes since the well-known Caspi et al. (2003) findings in a population cohort regarding gene-environment interactions.

Considering the evidence regarding sexual dimorphism and the serotonergic system influence on ADHD and its comorbidities, this study aims to assess the

involvement of *HTR1B* variants in ADHD susceptibility as well as externalizing and internalizing comorbidities, considering sex differences in the analyses.

## **Materials and methods**

### **Sample**

The ADHD sample consisted of 564 adults recruited in the adult division of the ADHD Outpatient Clinic from Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). The inclusion criteria were: to be of European descent, aged 18 years or older and diagnosed with ADHD according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV) (APA, 1994). Presence of clinically significant neurological diseases that might affect cognition, head traumas, current or past history of psychosis, and  $IQ \leq 70$  were adopted as exclusion criteria. The severity of current ADHD symptoms was addressed by the Portuguese version of the Swanson, Nolan and Pedham Rating Scale-version IV (SNAP-IV) (Swanson, 1992). Psychiatric comorbidities were assessed through Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID-I) (First and Gibbon, 2004). All diagnoses were conducted by experienced psychiatrists.

The control sample, which screened negative to ADHD on the Adult Self-Rating Scale (ASRS-V1.1) (First et al. 2002), comprised 649 blood donors recruited at the same hospital. Both inclusion and exclusion criteria were the same used for the case sample, except for ADHD diagnosis.

All subjects signed an informed consent form approved by the Ethics Committees of the Hospital and the Federal University of Rio Grande do Sul (Institutional Review Board No. 00000921). Demographic description of the sample is provided in Table 1.

### **SNP selection**

SNPs were selected based on previous evidence of association with ADHD and its comorbidities and/or considering functionality of the polymorphism. The rs6296 is the most studied SNP of *HTR1B*, however, no functional effect has been described so

far (Gizer et al., 2009; Hawi et al., 2015). Functionality for rs11568817 and rs130058 was unraveled in a study that used a secreted alkaline phosphatase (SEAP) reporter gene system (Duan et al., 2003). The G allele of rs11568817 increases transcriptional activity and the T allele of rs130058 seems to reverse the effect of the G allele of rs11568817. Additionally, the G allele of rs13212041, located at 3'UTR, seems to disrupt a nucleotide critical site for the interaction of the gene with miR-96, being related to a higher transcription (Jensen et al., 2009).

### **Laboratory methods**

DNA was extracted from peripheral blood using salting-out method, adapted from Lahiri and Nurnberger (1991). Four polymorphisms were analyzed in this study (rs11568817, rs130058, rs6296 and rs13212041). The rs11568817 and rs13212041 SNPs were assessed through Taqman SNP genotyping assays (Applied Biosystems), according to manufacturer's recommended protocol. The other polymorphisms, rs130058 and rs6296, were evaluated through PCR-RFLP, in which the rs130058 was genotyped using the restriction enzyme Hsp92II, while rs6296 using HincII (adapted from Guimarães et al. 2009).

### **Statistical analyses**

Binary logistic regression analyses were performed to assess the effect of each individual SNP on the susceptibility to ADHD and comorbidities within ADHD. Considering the sample size and allele frequencies, all analyses were conducted under the dominant model (heterozygotes combined with the less frequent homozygotes). In the case-control analysis for ADHD, variables such as gender, major depressive disorder (MDD), generalized anxiety disorder (GAD), SUD, alcohol use disorders (AUD) and nicotine dependence were considered as potential confounders and were included in analyses if associations of  $P \leq 0.2$  with at least one of the outcomes and one of the SNPs tested. Since the literature suggests dimorphic sexual effect related to serotonergic genes and there is evidence of differential internalizing/externalizing



behavior prevalence between men and women, we performed the analysis of ADHD comorbidities (MDD, GAD, SUD, AUD and nicotine dependence) according to sex. It is noteworthy that SUD comprises alcohol, nicotine and other substances (APA, 2013) while nicotine dependence is reflected by at least one cigarette/day for at least 30 consecutive days (Mayhew et al., 2000; Wellman, 2004).

Correction for multiple comparisons was generated by 10.000 permutations to avoid spurious association, using the Max (T) permutation procedure by Plink. This procedure accounts for the correlation among SNPs, assuming not all SNPs are independent (Purcell et al. 2007). Since the outcomes are moderately correlated we did not proceed a more stringent correction. Hardy-Weinberg equilibrium was tested using Chi-squared test by PLINK software v.1.07 (Purcell et al., 2007). Haploview 4.2 software was used to evaluate the linkage disequilibrium among the *HTR1B* SNPs.

## Results

All SNPs were in Hardy-Weinberg Equilibrium in both samples. Linkage disequilibrium analyses provided high  $D'$  values (0.94 - 0.97) and low to moderate  $R^2$  values (0.16 – 0.51) for rs11568817, rs130058 and rs6296. However, since  $R^2$  values were low we decided not to perform haplotypic analyses.

In case-control analysis, no influence of *HTR1B* gene was detected on ADHD (Table 2). Concerning comorbidities in the ADHD sample, some pivotal associations were found. In men, rs11568817 G carriers and rs130058 T carriers presented increased risk for SUD (rs11568817 (OR = 2.27, P = 0.002, Pcorr = 0.009), rs130058 (OR = 1.98, P = 0.004, Pcorr = 0.018)). Splitting SUD into nicotine dependence and AUD, again associations of these two polymorphisms were found (Table 3). Analyses in women with ADHD pointed to associations of rs11568817 G allele with MDD, (OR = 1.76, P = 0.038), and GAD, (OR = 2.45, P = 0.01). Additionally, rs6296 C carriers were associated with protection to GAD (OR = 0.54, P = 0.035) (Table 4). Nevertheless, in women, only the association between rs11568817 and GAD remains significant after correction (Pcorr = 0.030). Analyses of externalizing behaviors in women

(Supplementary Table 1) and internalizing behaviors in men (Supplementary Table 2) were also conducted, but we did not find any significant association.

## Discussion

In this study, we add to previous evidence on the sexual dimorphic effects of the serotonergic system in psychiatry. Our most interesting finding is the association of rs11568817 G allele with different comorbidities in men and women, which is supported by previous converging findings. This is the first study to discuss the findings of different effects of *HTR1B* polymorphism in ADHD comorbidities differentiated by sex. Together with the Gressier et al. (2016) findings on 5-HTTLPR, our study with *HTR1B* constitute promising evidence on the relevance of serotonergic sexual dimorphism in a range of psychiatric phenotypes.

We found significant associations between *HTR1B* rs11568817 G allele with SUD and nicotine dependence in men, and GAD in women. In addition, we report nominal associations of the same polymorphism with AUD in men and MDD in women. Furthermore, rs130058 was associated with SUD and nominally with nicotine dependence in men, while rs6296 was nominally associated with GAD in women. These results are supported by inherent biological differences described in men and women, which contribute to distinct brain functions (Ratnu et al., 2017). Animal studies suggest the sexual dimorphism observed in the serotonergic system is probably due to serotonin synthesis, transportation and degradation – since they did not detect differences in number of serotonergic neurons (Kunimura et al., 2015). Both sex steroid hormones and effects of XX versus XY chromosomes also shape sex differences in the brain (Mccarthy et al. 2012; Gobinath, Choleris, and Galea 2017). Indeed, there are androgen receptors in some brain regions in which testosterone acts to influence cell survival, anatomical connectivity, and neurochemical specification (Mccarthy, 2009). Estrogen was reported to directly influence the neurite growth of serotonergic neurons expressing estrogen receptor ER $\alpha$  and ER $\beta$  (Lu et al., 2004) and also reducing the density and binding of serotonin receptors in the rat brain after estrogen administration (Biegon and McEwen, 1982). Concerning sexual chromosomes, there are some X and

Y non-homologous regions. Hereupon, *SRY* gene, located at Y chromosome, encodes a transcription factor that regulates monoamine oxidase A (*MAO A*) promoter (Wu et al., 2009). *MAO A* catalyzes the oxidative deamination of monoamine neurotransmitters, which include serotonin. These factors could be involved in differences of morphology and physiology that might lead to changes in the interactions with environment (Mccarthy et al., 2012). Additionally, emerging evidence suggests DNA methylation is also important to shape sexual differentiation of the brain (Nugent et al. 2015; Hodes et al. 2017).

The association between rs11568817 G carriers and SUD and the nominal association with AUD, both in men, reinforce a previous report. In an independent study from the same Brazilian city, Contini et al (2012) detected an association between the same allele G and alcohol dependence in a sample that was composed exclusively of men. Afterwards, a meta-analysis pointed to association of rs11568817 G allele with alcohol, cocaine and heroin dependence in Europeans (Cao et al., 2013). Finally, rs11568817 has been reported as associated with other phenotypes as reduction of attention under escitalopram treatment for GAD (G carriers) (Lenze et al., 2013) and higher scores of suicide ideation among Han Chinese (T carriers) (Wang et al., 2009). The present finding of rs130058 T allele with SUD also add to previously available evidence from a meta-analysis (Cao et al., 2013). Concerning specifically AUD, similarly to Contini et al. (2012) we did not detect association with rs130058. Only nominal associations were detected for some polymorphism and outcomes (rs130058 with nicotine dependence, and of rs11568817 with MDD). Nevertheless, the overall evidence reinforces the possibility of these SNPs contribution for the respective disorders, mainly taking previous reports into account (Cao et al., 2013; Wang et al., 2009) and the significant findings reported here.

In the current work, we found a suggestion of protective effect of rs6296 C allele to GAD. Previous studies were conducted considering obsessive compulsive disorder (OCD) itself or as comorbidity, where the G allele conferred risk (Kim et al. 2009; Mundo et al. 2002). In a quantitative trait analysis, which assessed severity of OCD, Camarena et al. (2004) found preferential transmission of G allele with higher obsession scores.

Notwithstanding, Mekli and colleagues reported that rs6296 C allele confers risk to anxiety in adults in the presence of stressful life events exposure (Mekli et al., 2011). Therefore, as opposed to rs11568817 and rs130058, the overall findings with rs6296 are less clear, despite more studied. A possible explanation for these complex findings could be the presence of other SNPs in linkage disequilibrium with rs6296, whose functionality is unknown.

Our study should be viewed considering some limitations. Despite the fact that a sexual dimorphism effect was detected for *HTR1B*, we could not include hormones or other biological markers as microRNAs and epigenetics as variables in an experimental design. In this sense, we cannot infer in which extension the sexual hormones and other biological factors have a quantitative effect in rs11568817 G carriers. A methylome study approach on *HTR1B* would give us a new comprehension of the sexual dimorphic effects obtained for rs11568817 on ADHD comorbidities, since a differential methylation of *HTR1B* already was associated as risk factor for psychiatric phenotypes when mediated by rs11568817 genotype (Moul et al., 2015). Finally, our sample size is moderate to assess some small effects expected from genetic contribution to the analyzed disorders. Finally, the split of the sample in men and women to achieve more biologically homogeneous subgroups was performed at the cost of statistical power decrease.

As conclusion, we were able to contribute to previous results concerning the role of *HTR1B* in psychiatric disorders. Above all, our findings reinforce the evidence of sexual dimorphic effects of the serotonergic system in psychiatry. More studies are warranted taking into account the differences between men and women, since they may have very important clinical implications in susceptibility, clinical response and other relevant outcomes.

## References

- American Psychiatric Association, A., 2004. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - *DSM-IV*, Forth Edition. ed. American Psychiatric Association, Washington DC.
- American Psychiatric Association, A., 2013. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - *DSM-5*, Fifth Edit. ed. American Psychiatric Association, Washington DC.
- Ashare, R.L., Norris, C.J., Wileyto, E.P., Cacioppo, J.T., Strasser, A.A., 2013. Individual differences in positivity offset and negativity bias: Gender-specific associations with two serotonin receptor genes. *Pers. Individ. Dif.* 55, 469–473. doi:10.1016/j.paid.2013.04.009
- Banerjee, E., Banerjee, D., Chatterjee, A., Sinha, S., Nandagopal, K., 2012. Selective maternal inheritance of risk alleles and genetic interaction between serotonin receptor-1B (5-HTR1B) and serotonin transporter (SLC6A4) in ADHD. *Psychiatry Res.* 200, 1083–1085. doi:10.1016/j.psychres.2012.04.003
- Biederman, J., Faraone, S. V, Monuteaux, M.C., Bober, M., Cadogen, E., 2004. Gender effects on Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in adults, revisited. *Biol. Psychiatry* 55, 692–700. doi:10.1016/j.biopsych.2003.12.003
- Biegón, A., McEwen, B., 1982. Modulation by estradiol of serotonin receptors in brain. *J. Neurosci.* 2, 199–205.
- Bonvicini, C., Faraone, S. V, Scassellati, C., 2016. Attention deficit hyperactivity disorder in adults: A systematic review and meta-analysis of genetic, pharmacogenetic and biochemical studies. *Mol. Psychiatry* 21, 872–884. doi:10.1038/mp.2016.74
- Brikell, I., Kuja-halkola, R., Larsson, H., 2015. Heritability of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder in Adults. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* 168, 406–413. doi:10.1002/ajmg.b.32335
- Brookes, K., Xu, X., Chen, W., Zhou, K., Neale, B., Lowe, N., Anney, R., Aneey, R., Franke, B., Gill, M., Ebstein, R., Buitelaar, J., Sham, P., Campbell, D., Knight, J.,

Andreou, P., Altink, M., Arnold, R., Boer, F., Buschgens, C., Butler, L., Christiansen, H., Feldman, L., Fleischman, K., Fliers, E., Howe-Forbes, R., Goldfarb, A., Heise, A., Gabriëls, I., Korn-Lubetzki, I., Johansson, L., Marco, R., Medad, S., Minderaa, R., Mulas, F., Müller, U., Mulligan, A., Rabin, K., Rommelse, N., Sethna, V., Sorohan, J., Uebel, H., Psychogiou, L., Weeks, A., Barrett, R., Craig, I., Banaschewski, T., Sonuga-Barke, E., Eisenberg, J., Kuntsi, J., Manor, I., McGuffin, P., Miranda, A., Oades, R.D., Plomin, R., Roeyers, H., Rothenberger, A., Sergeant, J., Steinhausen, H.-C., Taylor, E., Thompson, M., Faraone, S. V, Asherson, P., 2006. The analysis of 51 genes in DSM-IV combined type attention deficit hyperactivity disorder: association signals in DRD4, DAT1 and 16 other genes. *Mol. Psychiatry* 11, 934–953.  
doi:10.1038/sj.mp.4001869

Camarena, B., Aguilar, A., Loyzaga, C., Nicolini, H., 2004. A family - based association study of the 5 - HT - 1Dbeta receptor gene in obsessive - compulsive disorder . *PubMed Commons. J. Neuropsychopharmacol.* 7, 14731309.  
doi:10.1017/S1461145703003869

Cao, J., LaRocque, E., Li, D., 2013. Associations of the 5-hydroxytryptamine (Serotonin) Receptor 1B Gene (HTR1B) with Alcohol, Cocaine, and Heroin Abuse. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* 169–176.  
doi:10.1002/ajmg.b.32128.Associations

Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T.E., Taylor, A., Craig, I.W., Harrington, H., McClay, J., Mill, J., Martin, J., Braithwaite, A., Poulton, R., 2003. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 301, 386–389. doi:10.1126/science.1083968

Caye, A., Spadini, A. V, Karam, R.G., Grevet, E.H., Rovaris, D.L., Bau, C.H.D., Rohde, L.A., Kieling, C., 2016. Predictors of persistence of ADHD into adulthood: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry* 25, 1151–1159. doi:10.1007/s00787-016-0831-8

Conner, T.S., Jensen, K.P., Tennen, H., Furneaux, H.M., Kranzler, H.R., Covault, J., 2010. Functional polymorphisms in the serotonin 1B receptor gene (HTR1B)

- predict self-reported anger and hostility among young men. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 153B, 67–78. doi:10.1002/ajmg.b.30955
- Contini, V., Bertuzzi, G.P., Polina, E.R., Hunemeier, T., Hendler, E.M., Hutz, M.H., Bau, C.H.D., 2012a. A haplotype analysis is consistent with the role of functional HTR1B variants in alcohol dependence. *Drug Alcohol Depend.* 122, 100–104. doi:10.1016/j.drugalcdep.2011.09.020
- Contini, V., Victor, M.M., Bertuzzi, G.P., Salgado, C. a I., Picon, F.A., Grevet, E.H., Rohde, L.A., Belmonte-de-Abreu, P., Bau, C.H.D., 2012b. No significant association between genetic variants in 7 candidate genes and response to methylphenidate treatment in adult patients with ADHD. *J. Clin. Psychopharmacol.* 32, 820–3. doi:10.1097/JCP.0b013e318270e727
- Davies, W., 2014. Sex differences in Attention Deficit Hyperactivity Disorder: Candidate genetic and endocrine mechanisms. *Front. Neuroendocrinol.* 35, 331–346. doi:10.1016/j.yfrne.2014.03.003
- Davies, W., Wilkinson, L.S., 2006. It is not all hormones: Alternative explanations for sexual differentiation of the brain. *Brain Res.* 26, 36–45. doi:10.1016/j.brainres.2006.09.105
- Duan, J., Sanders, a R., Molen, J.E. Vander, Martinolich, L., Mowry, B.J., Levinson, D.F., Crowe, R.R., Silverman, J.M., Gejman, P. V, 2003. Polymorphisms in the 5'-untranslated region of the human serotonin receptor 1B (HTR1B) gene affect gene expression. *Mol. Psychiatry* 8, 901–910. doi:10.1038/sj.mp.4001403
- Faraone, S. V., Biederman, J., Mick, E., 2006. The age-dependent decline of attention deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis of follow-up studies. *Psychol. Med.* 36, 159–165. doi:10.1017/S003329170500471X
- First, M.B., Gibbon, M., 2004. The Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID-I) and the Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis II Disorders (SCID-II)., In: *Comprehensive handbook of Psychological Assessment, Vol.2: Personality Assessment*. pp.134–143. <http://dx.doi.org/10.1002/cpp>.
- First, M.B., Spitzer, R.L., Gibbon, M., et al. 2002. Structured Clinical Interview for DSM-IV-

TR Axis I Disorders, Patient Edition (SCID-I/P,11/2002revision), for DSMIV.

Fonseca, D.J., Mateus, H.E., Gálvez, J.M., Forero, D.A., Gutierrez, C.T., Meerbeke, A. V, Velez-van-meerbeke, A., 2015. Lack of association of polymorphisms in six candidate genes in colombian ADHD patients. *Ann. Neurosci.* 22, 217–221.

Forero, D.A., Arboleda, G.H., Vasquez, R., Arboleda, H., 2009. Candidate genes involved in neural plasticity and the risk for attention-deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis of 8 common variants. *J. Psychiatry Neurosci.* 34, 361–366.

Garcia, C.R., Bau, C.H.D., Silva, K.L., Callegari-jacques, S.M., Salgado, C.A.I., Fischer, A.G., Victor, M.M., Sousa, N.O., Karam, R.G., Rohde, L.A., Belmonte-de-abreu, P., Grevet, E.H., 2012. The burdened life of adults with ADHD: Impairment beyond comorbidity. *Eur. Psychiatry* 27, 309–313.  
doi:10.1016/j.eurpsy.2010.08.002

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

Gobinath, A.R., Choleris, E., Galea, L.A.M., 2017. Sex, Hormones, and Genotype Interact To Influence Psychiatric Disease, Treatment, and Behavioral Research. *J. Neurosci. Res.* 95, 50–64. doi:10.1002/jnr.23872

Gressier, F., Calati, R., Serretti, A., 2016. 5-HTTLPR and gender differences in affective disorders: A systematic review. *J. Affect. Disord.* 190, 193–207.  
doi:10.1016/j.jad.2015.09.027

Guimarães, A.P., Schmitz, M., Polanczyk, G. V., Zeni, C., Genro, J., Roman, T., Rohde, L. a., Hutz, M.H., 2009. Further evidence for the association between attention deficit/ hyperactivity disorder and the serotonin receptor 1B gene. *J. Neural Transm.* 116, 1675–1680. doi:10.1007/s00702-009-0305-y

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

Hawi, Z., Dring, M., Kirley, a, Foley, D., Kent, L., Craddock, N., Asherson, P., Curran, S., Gould, a, Richards, S., Lawson, D., Pay, H., Turic, D., Langley, K., Owen, M., O'Donovan, M., Thapar, a, Fitzgerald, M., Gill, M., 2002. Serotonergic system



- and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): a potential susceptibility locus at the 5-HT(1B) receptor gene in 273 nuclear families from a multi-centre sample. *Mol. Psychiatry* 7, 718–725. doi:10.1038/sj.mp.4001048
- Heiser, P., Dempfle, a., Friedel, S., Konrad, K., Hinney, a., Kiefl, H., Walitza, S., Bettecken, T., Saar, K., Linder, M., Warnke, a., Herpertz-Dahlmann, B., Schäfer, H., Remschmidt, H., Hebebrand, J., 2007. Family-based association study of serotonergic candidate genes and attention-deficit/hyperactivity disorder in a German sample. *J. Neural Transm.* 114, 513–521. doi:10.1007/s00702-006-0584-5
- Hodes, G.E., Walker, D.M., Labont, B., Nestler, E.J., Russo, S.J., 2017. Mini-Review Understanding the Epigenetic Basis of Sex Differences in Depression. *J. Neurosci. Res.* 95, 692–702. doi:10.1002/jnr.23876
- Ickowicz, A., Feng, Y., Wigg, K., Quist, J., Pathare, T., Roberts, W., Malone, M., Schachar, R., Tannock, R., Kennedy, J.L., Barr, C.L., 2007. The serotonin receptor HTR1B: gene polymorphisms in attention deficit hyperactivity disorder. *Am. J. Med. Genet. Part B, Neuropsychiatr. Genet.* 144B, 121–125. doi:10.1002/ajmg.b.30398
- Jensen, K.P., Covault, J., Conner, T.S., Tennen, H., Kranzler, H.R., Furneaux, H.M., 2009. A common polymorphism in serotonin receptor 1B mRNA moderates regulation by miR-96 and associates with aggressive human behaviors. *Mol. Psychiatry* 14, 381–389. doi:10.1038/mp.2008.15
- Kessler, R.C., Adler, L., Barkley, R., Biederman, J., Conners, C.K., Demler, O., Faraone, S. V, Ph, D., Greenhill, L., Howes, M.J., Secnik, K., Spencer, T., Ustun, B., Walters, E.E., Zaslavsky, A.M., 2006. The prevalence and correlates of adult ADHD in the United States: Results from the National Comorbidity Survey Replication. *Am. J. Psychiatry* 163, 716–723. doi:10.1176/appi.ajp.163.4.716.
- Kim, J.W., Waldman, I.D., Faraone, S. V, Biederman, J., Doyle, A.E., Purcell, S., Arbeitman, L., Fagerness, J., Sklar, P., Smoller, J.W., 2007. Investigation of parent-of-origin effects in ADHD candidate genes. *Am. J. Med. Genet. Part B, Neuropsychiatr. Genet. Off. Publ. Int. Soc. Psychiatr. Genet.* 144, 776–780.

doi:10.1002/ajmg.b.30519

- Kim, S.J., Namkoong, K., Kang, J.I., Kim, C., 2009. Association of a 5 - HT1Dbeta receptor gene polymorphism with obsessive - compulsive disorder in Korean male subjects. *Neuropsychobiology* 59, 96–99. doi:10.1159/000209861
- Kunimura, Y., Iwata, K., Iijima, N., Kobayashi, M., Ozawa, H., 2015. Effect of sex steroid hormones on the number of serotonergic neurons in rat dorsal raphe nucleus. *Neurosci. Lett.* 594, 127–132. doi:10.1016/j.neulet.2015.03.060
- Lahiri, D.K., Nurnberger, J.I., 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 19, 5444. doi:10.1093/nar/19.19.5444
- Lenze, E.J., Dixon, D., Nowotny, P., Lotrich, F., Doré, P.M., Pollock, B.G., Hinrichs, A.L., Butters, M.A., 2013. Escitalopram reduces attentional performance in anxious older adults with high-expression genetic variants at serotonin 2A and 1B receptors. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 16, 279–288. doi:10.1017/S1461145712000351.Escitalopram
- Li, J., Wang, Y., Zhou, R., Zhang, H., Yang, L., Wang, B., Khan, S., Faraone, S. V., 2005. Serotonin 5-HT1B Receptor Gene and Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Chinese Han Subjects. *Am. J. Med. Genet. - Neuropsychiatr. Genet.* 132, 59–63. doi:10.1002/ajmg.b.30075
- Lu, H., Nishi, M., Matsuda, K., Kawata, M., 2004. Estrogen reduces the neurite growth of serotonergic cells expressing estrogen receptors. *Neurosci. Res.* 50, 23–28. doi:10.1016/j.neures.2004.06.010
- Martinowich, K., Lu, B., 2008. Interaction between BDNF and Serotonin: Role in Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology* 33, 73–83. doi:10.1038/sj.npp.1301571
- Mayhew, K.P., Flay, B.R., Mott, J. a, 2000. Stages in the development of adolescent smoking. *Drug Alcohol Depend.* 59 Suppl 1, S61–S81. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0376-8716(99)00165-9
- Mccarthy, M.M., 2009. *Hormones, Brain and Behavior: Sexual Differentiation of the Brain: Mode, Mechanisms, and Meaning*, 2nd ed. Academic Press.

- Mccarthy, M.M., Arnold, A.P., Ball, G.F., Blaustein, J.D., Vries, G.J. De, 2012. Sex Differences in the Brain : The Not So Inconvenient Truth. *J. Neurosci.* 32, 2241–2247. doi:10.1523/JNEUROSCI.5372-11.2012
- Mekli, K., Payton, A., Miyajima, F., Platt, H., Thomas, E., Downey, D., Lloyd-williams, K., Chase, D., Toth, Z.G., Elliott, R., Ollier, W.E., Anderson, I.M., Deakin, J.F.W., Bagdy, G., Juhasz, G., 2011. The HTR1A and HTR1B receptor genes influence stress-related information processing. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 21, 129–139. doi:10.1016/j.euroneuro.2010.06.013
- Moffitt, T.E., Houts, R., Asherson, P., Belsky, D.W., Corcoran, D.L., Hammerie, M.B.A., Harrington, H.B.A., Hogan, S.M.S.W., Meier, M.H., Polanczyk, G. V, Poulton, R., Ramrakha, S., Sugden, K., Williams, B., Rohde, L.A., Casoi, A., 2015. Is Adult ADHD a Childhood-Onset Neurodevelopmental Disorder? Evidence From a Four-Decade Longitudinal Cohort Study. *Am. J. Psychiatry* 172, 967–977. doi:10.1176/appi.ajp.2015.14101266
- Moul, C., Dobson-Stone, C., Brennan, J., Hawes, D.J., Dadds, M.R., 2015. Serotonin 1B Receptor Gene (HTR1B) Methylation as a Risk Factor for Callous-Unemotional Traits in Antisocial Boys. *PLoS One* 10, e0126903. doi:10.1371/journal.pone.0126903
- Mundo, E., Richter, M.A., Zai, G., Sam, F., McBride, J., Macciardi, F., Kennedy, J.L., 2002. 5HT1DB Receptor gene implicated in the pathogenesis of Obsessive-Compulsive Disorder: further evidence from a family-based association study. *Mol. Psychiatry* 7, 805–809. doi:10.1038/sj.mp.4001059
- Neale, B.M., Medland, S.E., Ripke, S., Asherson, P., Franke, B., Lesch, K., Romanos, J., Walitza, S., Warnke, A., Meyer, J., Palmason, H., Buitelaar, J., Loo, S., Hakonarson, H., Elia, J., 2010. Association Studies of Attention Deficit/Hyperactivity Disorder. *J. Am. Acad. child Adolesc. Psychiatr.* 49, 884–897. doi:10.1016/j.jaac.2010.06.008
- Nugent, B.M., Wright, C.L., Shetty, A.C., Hodes, G.E., Lenz, K.M., Mahurkar, A., Russo, S.J., Devine, S.E., Mccarthy, M.M., 2015. Brain feminization requires active repression of masculinization via DNA methylation. *Neuroscience* 18, 690–

700. doi:10.1038/nn.3988

- Pan, Y., Qiao, L., Xue, X., Fu, J., 2015. Association between ANKK1 (rs1800497) polymorphism of DRD2 gene and attention deficit hyperactivity disorder: A meta-analysis. *Neurosci. Lett.* 590, 101–105. doi:10.1016/j.neulet.2015.01.076
- Purcell, S., Neale, B., Todd-brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A.R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., Bakker, P.I.W. De, Daly, M.J., Sham, P.C., 2007. PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 559–575. doi:10.1086/519795
- Quist, J.F., Barr, C.L., Schachar, R., Roberts, W., Malone, M., Tannock, R., Basile, V.S., Beitchman, J., 2003. The serotonin 5-HT1B receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Mol. Psychiatry* 8, 98–102. doi:10.1038/sj.mp.4001244
- Rasmussen, K., Levander, S., 2009. Untreated ADHD in Adults Are There Sex Differences in Symptoms, Comorbidity, and Impairment? *J. Atten. Disord.* 353–360.
- Ratnu, V.S., Emami, M.R., Bredy, T.W., 2017. Genetic and Epigenetic Factors Underlying Sex Differences in the Regulation of Gene Expression in the Brain. *J. Neurosci. Res.* 95, 301–310. doi:10.1002/jnr.23886
- Ribasés, M., Ramos-Quiroga, J. a, Hervás, a, Bosch, R., Bielsa, a, Gastaminza, X., Artigas, J., Rodriguez-Ben, S., Estivill, X., Casas, M., Cormand, B., Bayés, M., 2009. Exploration of 19 serotonergic candidate genes in adults and children with attention-deficit/hyperactivity disorder identifies association for 5HT2A, DDC and MAOB. *Mol. Psychiatry* 14, 71–85. doi:10.1038/sj.mp.4002100
- Rucklidge, J.J., 2010. Gender Differences in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Psychiatr. Clin. North Am.* 33, 357–373. doi:10.1016/j.psc.2010.01.006
- Rucklidge, J.J., Downs-woolley, M., Taylor, M., Brown, J.A., Harrow, S., 2016. Psychiatric Comorbidities in a New Zealand Sample of Adults With ADHD. *J. Atten. Disord.* 20, 1030–1038. doi:10.1177/1087054714529457
- Sánchez-Mora, C., Ramos-Quiroga, J.-A., Garcia-Martínez, I., Fernàndez-Castillo, N., Bosch, R., Richarte, V., Palomar, G., Nogueira, M., Corrales, M., Daigne, C.,

- Martínez-Luna, N., Grau-Lopez, L., Toma, C., Cormand, B., Roncero, C., Casas, M., Ribasés, M., 2013. Evaluation of single nucleotide polymorphisms in the miR-183-96-182 cluster in adulthood attention-deficit and hyperactivity disorder (ADHD) and substance use disorders (SUDs). *Eur. Neuropsychopharmacol.* 23, 1463–73. doi:10.1016/j.euroneuro.2013.07.002
- Seedat, S., Scott, K.M., Angermeyer, M.C., Bromet, E.J., Brugha, T.S., Girolamo, G. De, Haro, J.M., 2009. Cross-national associations between gender and mental disorders in the WHO World Mental Health Surveys. *Arch. Gen. Psychiatry* 66, 785–795. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2009.36.Cross-national
- Seney, M.L., Ekong, K.I., Ding, Y., Tseng, G.C., Sibille, E., 2013. Sex chromosome complement regulates expression of mood-related genes. *Biol. Sex Differ.* 4–20.
- Smoller, J.W., Biederman, J., Arbeitman, L., Doyle, A.E., Fagerness, J., Perlis, R.H., Sklar, P., Faraone, S. V, 2006. Association between the 5HT1B receptor gene (HTR1B) and the inattentive subtype of ADHD. *Biol. Psychiatry* 59, 460–7. doi:10.1016/j.biopsych.2005.07.017
- Sobanski, E., Brüggemann, D., Alm, B., Kern, S., Deschner, M., Schubert, T., Philippsen, A., Rietschel, M., 2007. Psychiatric comorbidity and functional impairment in a clinically referred sample of adults with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 257, 371–377. doi:10.1007/s00406-007-0712-8
- Swanson JM (1992) School-based assessments and interventions for ADD students. KC Publishing, Irvine
- Tekin, S., Cummings, J.L., 2002. Frontal – subcortical neuronal circuits and clinical neuropsychiatry An update. *J. Psychiatr. Res.* 53, 647–654.
- Wang, S., Zhang, K., Xu, Y., Sun, N., Shen, Y., Xu, Q., 2009. An association study of the serotonin transporter and receptor genes with the suicidal ideation of major depression in a Chinese Han population. *Psychiatry Res.* 170, 204–207. doi:10.1016/j.psychres.2008.12.006
- Wellman, R.J., 2004. Short term patterns of early smoking acquisition. *Tob. Control* 13, 251–257. doi:10.1136/tc.2003.005595

- Wu, J.B., Chen, K., Li, Y., Fai, Y., Lau, C., Shih, J.C., 2009. Regulation of monoamine oxidase A by the SRY gene on the Y chromosome. *J. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 23, 4029–4038. doi:10.1096/fj.09
- Ye, C., Hu, Z., Wu, E., Yang, X., Buford, U.J., Guo, Z., Saveanu, R. V, 2016. Two SNAP-25 genetic variants in the binding site of multiple microRNAs and susceptibility of ADHD: A meta-analysis. *J. Psychiatr. Res.* 81, 56–62. doi:10.1016/j.jpsychires.2016.06.007
- Zai, G., Alberry, B., Arloth, J., Bánlaki, Z., Bares, C., Boot, E., Camilo, C., Chadha, K., Chen, Q., Cole, C.B., Cost, K.T., Crow, M., Ekpor, I., Fischer, S.B., Flatau, L., Gagliano, S., Kirli, U., Kukshal, P., Labrie, V., Lang, M., Lett, T.A., Maffioletti, E., Maier, R., Mihaljevic, M., Mittal, K., Monson, E.T., Brien, N.L.O., Østergaard, S.D., Ovenden, E., Patel, S., Peterson, R.E., Pouget, J.G., Rovaris, D.L., Seaman, L., Shankarappa, B., Tsetsos, F., Vereczkei, A., Wang, C., Xulu, K., Yuen, R.K.C., Zhao, J., Zai, C.C., Kennedy, J.L., 2016. Rapporteur summaries of plenary, symposia, and oral sessions from the XXIIIrd World Congress of Psychiatric Genetics Meeting in Toronto, Canada, 16 – 20 October 2015. *Psychiatr. Genet.* 26, 229–257. doi:10.1097/YPG.0000000000000148
- Zaidi, Z.F., 2010. Gender Differences in Human Brain : A Review. *Open Anat. J.* 2, 37–55.

**Table 1.** Clinical characterization of the sample.

	<b>ADHD N=549</b>	<b>Controls N=645</b>		
	<i>Mean (SD)</i>	<i>Mean (SD)</i>	<i>t</i>	<i>P-value</i>
<b>Age</b>	33.7 (10.79)	29.1 (8.67)	8.16	<0.001
	<i>N (%)</i>	<i>N (%)</i>	$\chi^2$	<i>P-value</i>
<b>Men</b>	301 (54.8)	318 (49.3)	3.41	0.065
<b>Substance Use Disorder</b>	259 (47.3)	125 (19.4)	103.56	<0.001
<b>Nicotine Dependence</b>	236 (43)	114 (17.7)	90.18	<0.001
<b>Alcohol Dependence/Abuse</b>	76 (13.9)	15 (2.3)	54.28	<0.001
<b>Generalized Anxiety Disorder</b>	110 (20)	66 (10.3)	21.70	<0.001
<b>Major Depressive Disorder</b>	210 (38.3)	179 (27.8)	14.27	<0.001

**Table 2.** *HTR1B* genotype and allele frequencies in subjects with ADHD and controls.

	<b>Cases</b>	<b>Controls</b>	<b>OR (CI 95%)<sup>a</sup></b>	<b>P-value</b>
	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>		
<b>rs11568817</b>				
<b>TT</b>	172 (30.7)	180 (27.8)	1.25 (0.96 – 1.63)	0.096
<b>GG/GT</b>	389 (69.3)	468 (72.2)		
<b>rs130058</b>				
<b>AA</b>	264 (47.4)	300 (47.5)	1.03 (0.81 – 1.31)	0.815
<b>TT/TA</b>	293 (52.6)	332 (52.5)		
<b>rs6296</b>				
<b>GG</b>	288 (51.0)	341 (53.9)	0.83 (0.65 – 1.06)	0.134
<b>CC/CG</b>	276 (49.0)	294 (46.1)		
<b>rs13212041</b>				
<b>AA</b>	376 (66.7)	428 (66.1)	1.01 (0.78 – 1.30)	0.970
<b>GG/GA</b>	188 (33.3)	220 (33.9)		

Covariates: sex, major depressive disorder, generalized anxiety disorder, substance use disorder. OR = Odds Ratio; CI = Confidence Interval. OR (CI 95%)<sup>a</sup> for TT, AA, GG, AA as reference.



**Table 3.** Association results of externalizing phenotypes in men with ADHD; N=301.

SNP		Genotype groups N (%)		OR (CI 95%)	P-value
		Reference	Test		
<b>rs11568817</b>			<b>TT</b>	<b>GG + GT</b>	
Substance Use Disorder*	Yes	30 (19.48)	124 (80.52)	2.27 (1.34 – 3.83)	<b>0.002<sup>a</sup></b>
	No	51 (35.42)	93 (64.58)		
Nicotine Dependence	Yes	27 (19.71)	110 (80.29)	2.09 (1.23 – 3.57)	<b>0.006<sup>b</sup></b>
	No	55 (33.95)	107 (66.05)		
Alcohol Dependence/Abuse	Yes	9 (15.79)	48 (84.21)	2.27 (1.06 – 4.88)	<b>0.035<sup>c</sup></b>
	No	72 (29.87)	169 (70.13)		
<b>rs130058</b>			<b>AA</b>	<b>TT + TA</b>	
Substance Use Disorder*	Yes	55 (35.48)	100 (64.52)	1.98 (1.24 – 3.15)	<b>0.004<sup>d</sup></b>
	No	74 (52.11)	68 (47.89)		
Nicotine Dependence	Yes	50 (36.23)	88 (63.77)	1.76 (1.11 – 2.80)	<b>0.017<sup>e</sup></b>
	No	80 (50.00)	80 (50.00)		
Alcohol Dependence/Abuse	Yes	19 (33.33)	38 (66.66)	1.69 (0.92 – 3.10)	0.089
	No	110 (45.83)	130 (54.17)		
<b>rs6296</b>			<b>GG</b>	<b>GC + CC</b>	
Substance Use Disorder*	Yes	89 (57.42)	66 (42.58)	0.77 (0.49 – 1.22)	0.267
	No	74 (51.03)	71 (48.97)		
Nicotine Dependence	Yes	81 (58.7)	57 (41.3)	0.72 (0.45 – 1.13)	0.146
	No	82 (50.31)	81 (49.69)		
Alcohol Dependence/Abuse	Yes	33 (57.89)	24 (42.11)	0.84 (0.47 – 1.50)	0.549
	No	130 (53.5)	113 (46.5)		
<b>rs13212041</b>			<b>AA</b>	<b>TT + TA</b>	
Substance Use Disorder*	Yes	105 (67.74)	50 (32.26)	0.83 (0.51 – 1.33)	0.434
	No	92 (63.45)	53 (36.55)		
Nicotine Dependence	Yes	91 (65.94)	47 (34.06)	0.96 (0.60 – 1.55)	0.868
	No	106 (65.03)	57 (34.97)		
Alcohol Dependence/Abuse	Yes	41 (71.93)	16 (28.07)	0.70 (0.37 – 1.32)	0.269
	No	156 (64.2)	87 (35.8)		

\*Substance Use Disorder (SUD) - including alcohol dependence/abuse, nicotine dependence and other drugs.

OR = Odds Ratio; CI = Confidence Interval; <sup>a</sup> P<sub>corr</sub> = 0.009; <sup>b</sup> P<sub>corr</sub> = 0.025; <sup>c</sup> P<sub>corr</sub> = 0.077; <sup>d</sup> P<sub>corr</sub> = 0.018; <sup>e</sup> P<sub>corr</sub> = 0.067.

P<sub>corr</sub> obtained by 10000 permutations.

**Table 4.** Association results of internalizing phenotypes in women with ADHD; N=248.

SNP		Genotype groups N (%)		OR (CI 95%)	P-value
		Reference	Test		
<b>rs11568817</b>		<b>TT</b>	<b>GG + GT</b>		
Major Depressive Disorder	Yes	32 (27.59)	84 (72.41)	1.76 (1.03 – 3.01)	<b>0.038<sup>a</sup></b>
	No	53 (40.15)	79 (59.85)		
Generalized Anxiety Disorder	Yes	13 (20.64)	50 (79.36)	2.45 (1.24 – 4.83)	<b>0.010<sup>b</sup></b>
	No	72 (38.92)	113 (61.08)		
<b>rs130058</b>		<b>AA</b>	<b>AT + TT</b>		
Major Depressive Disorder	Yes	54 (42.52)	60 (57.48)	1.42 (0.86 – 2.36)	0.171
	No	73 (62.39)	57 (37.61)		
Generalized Anxiety Disorder	Yes	27 (44.26)	34 (55.74)	1.52 (0.85 – 2.72)	0.16
	No	100 (54.65)	83 (45.35)		
<b>rs6296</b>		<b>GG</b>	<b>GC + CC</b>		
Major Depressive Disorder	Yes	51 (43.97)	65 (56.03)	1.28 (0.77 – 2.10)	0.342
	No	66 (50.00)	66 (50.00)		
Generalized Anxiety Disorder	Yes	37 (58.73)	26 (41.27)	0.54 (0.30 – 0.96)	<b>0.035<sup>c</sup></b>
	No	80 (43.24)	105 (56.76)		
<b>rs13212041</b>		<b>AA</b>	<b>AG + GG</b>		
Major Depressive Disorder	Yes	88 (75.86)	28 (24.14)	0.58 (0.33 – 1.00)	0.05
	No	85 (64.39)	47 (35.61)		
Generalized Anxiety Disorder	Yes	42 (66.66)	21 (33.33)	1.21 (0.66 – 2.24)	0.536
	No	131 (70.81)	54 (29.19)		

OR = Odds Ratio; CI = Confidence Interval; <sup>a</sup>P<sub>corr</sub> = 0.118; <sup>b</sup>P<sub>corr</sub> = 0.031; <sup>c</sup>P<sub>corr</sub> = 0.159. P<sub>corr</sub> obtained by 10000 permutations.

**Supplementary table 1.** Association results of externalizing phenotypes in women with ADHD; N=248.

SNP		Genotype groups N (%)		OR (CI 95%)	P-value
		Reference	Test		
<b>rs11568817</b>		<b>TT</b>	<b>GG + GT</b>		
Substance Use Disorder*	Yes	39 (37.5)	65 (62.5)	1.28 (0.75 – 2.17)	0.363
	No	46 (31.94)	98 (68.06)		
Nicotine Dependence	Yes	37 (37.76)	61 (62.24)	1.29 (0.76 – 2.20)	0.351
	No	48 (32)	102 (68)		
Alcohol Dependence/Abuse	Yes	9 (47.37)	10 (52.63)	1.81 (0.71 – 4.65)	0.216
	No	76 (33.2)	153 (66.8)		
<b>rs130058</b>		<b>AA</b>	<b>TT + TA</b>		
Substance Use Disorder*	Yes	56 (54.9)	46 (45.1)	1.22 (0.73 – 2.03)	0.45
	No	71 (50)	71 (50)		
Nicotine Dependence	Yes	53 (55.21)	43 (44.79)	1.23 (0.74 – 2.06)	0.427
	No	74 (50)	74 (50)		
Alcohol Dependence/Abuse	Yes	13 (68.42)	6 (31.58)	2.11 (0.78 – 5.75)	0.144
	No	114 (50.66)	111 (49.33)		
<b>rs6296</b>		<b>GG</b>	<b>CC + CG</b>		
Substance Use Disorder*	Yes	43 (41.35)	61 (58.65)	0.67 (0.40 – 1.11)	0.119
	No	74 (51.38)	70 (48.61)		
Nicotine Dependence	Yes	39 (39.8)	59 (60.2)	0.61 (0.36 – 1.02)	0.061
	No	78 (52)	72 (48)		
Alcohol Dependence/Abuse	Yes	7 (36.84)	12 (63.16)	0.63 (0.24 – 1.66)	0.351
	No	110 (48.03)	119 (51.97)		
<b>rs13212041</b>					
Substance Use Disorder*	Yes	72 (69.23)	32 (30.77)	0.96 (0.55 – 1.66)	0.878
	No	101 (70.14)	43 (29.86)		
Nicotine Dependence	Yes	68 (69.39)	30 (30.61)	0.97 (0.56 – 1.69)	0.895
	No	105 (70)	45 (30)		
Alcohol Dependence/Abuse	Yes	13 (68.42)	6 (31.58)	0.93 (0.34 – 2.56)	0.918
	No	160 (69.87)	69 (30.13)		

\*Substance Use Disorder (SUD) - including alcohol dependence/abuse, nicotine dependence and other drugs.  
OR = Odds Ratio; CI = Confidence Interval.

**Supplementary table 2.** Association results of internalizing phenotypes in men with ADHD; N=299.

SNP		Genotype groups N (%)		OR (CI 95%)	P-value	
		Reference	Test			
<b>rs11568817</b>		<b>TT</b>	<b>GG + GT</b>			
	Major Depressive Disorder	Yes	20 (21.74)	72 (78.26)	0.650 (0.36 – 1.16)	0.143
		No	62 (29.95)	145 (70.05)		
	Generalized Anxiety Disorder	Yes	14 (29.79)	33 (70.21)	1.150 (0.58 – 2.28)	0.693
No		68 (25.95)	184 (74.05)			
<b>rs130058</b>		<b>AA</b>	<b>AT + TT</b>			
	Major Depressive Disorder	Yes	35 (37.63)	58 (62.37)	0.699 (0.42 – 1.15)	0.161
		No	95 (46.34)	110 (53.66)		
	Generalized Anxiety Disorder	Yes	20 (42.55)	27 (57.45)	0.949 (0.51 – 1.78)	0.872
No		100 (43.82)	141 (56.18)			
<b>rs6296</b>		<b>GG</b>	<b>GC + CC</b>			
	Major Depressive Disorder	Yes	53 (56.38)	41 (43.62)	1.140 (0.70 – 1.86)	0.601
		No	110 (53.14)	97 (46.86)		
	Generalized Anxiety Disorder	Yes	28 (59.57)	19 (40.43)	1.299 (0.69 – 2.45)	0.418
No		135 (53.15)	119 (46.85)			
<b>rs13212041</b>		<b>AA</b>	<b>AG + GG</b>			
	Major Depressive Disorder	Yes	65 (69.15)	29 (30.85)	1.274 (0.76 – 2.15)	0.363
		No	132 (63.77)	75 (36.23)		
	Generalized Anxiety Disorder	Yes	29 (61.7)	18 (38.3)	0.825 (0.43 – 1.57)	0.557
No		168 (66.14)	86 (33.86)			

OR = Odds Ratio; CI = Confidence Interval.

Capítulo 4

Discussão

---

## 1. Discussão geral

Apesar da evidente diferença entre homens e mulheres quanto ao perfil de transtornos psiquiátricos mais comuns, poucos estudos genéticos enfocam a possibilidade de efeitos genéticos no dimorfismo sexual. A presente dissertação abordou tais diferenças a partir de um gene (*HTR1B*) membro de um sistema (serotoninérgico) com fortes evidências prévias para tais tipos de efeitos dimórficos, obtendo resultados bastante consistentes com a hipótese do estudo. Em suma, os resultados sugerem que um mesmo perfil genético possa resultar em transtornos diferentes em cada sexo.

Tendo em vista que o estudo do TDAH foi por muito tempo restrito aos casos infantis, devido a um reconhecimento tardio de que esta patologia também pode se manifestar na vida adulta, pesquisas em amostras infantis são muito mais vastas do que aquelas relacionadas aos casos adultos. Apesar dos mesmos sintomas serem utilizados na prática clínica para a realização do diagnóstico em crianças e adultos, novos achados vão se somando no sentido de demonstrar que os mecanismos etiológicos podem diferir, podendo, inclusive, representar transtornos distintos (Caye et al. 2016; Moffitt et al. 2015). Algumas revisões reforçam essa hipótese, como por exemplo Cupertino et al. (2016) que ao analisar genes do complexo SNARE relata associações de alguns polimorfismos na amostra de crianças, mas não na de adultos e vice-versa.

No campo do estudo de contribuição genética em diferentes enfermidades, houve uma série de avanços no que tange ao desenvolvimento de técnicas laboratoriais. Dessa forma, uma das abordagens metodológicas que foi fortemente implementada na pesquisa de doenças multifatoriais é a análise de variantes genéticas em escala genômica. Tal estratégia se tornou uma realidade com as plataformas de micro-arranjos e com o desenvolvimento de programas com capacidade de processar a grande quantidade de dados gerados. Apesar do desenvolvimento de diferentes metodologias, alcançar tamanhos amostrais que garantam poder estatístico é uma forte limitação. Além disso, o reconhecimento de que o TDAH apresenta uma grande

heterogeneidade clínica exige que subgrupos mais homogêneos sejam selecionados, com o objetivo de detectar mais facilmente os componentes genéticos envolvidos na etiologia e na manifestação clínica associada à patologia. Contudo, o fracionamento da amostra em estudos genômicos ainda não representa uma possibilidade real, nem mesmo para os consórcios que foram criados na tentativa de contornar a problemática de pequeno tamanho amostral, e por consequência aumentar o poder das análises. Dessa forma, métodos de análise como a de genes candidatos – que consideram hipóteses prévias, as quais são formuladas com base no conhecimento prévio de estudos da fisiopatologia do transtorno – continuam sendo utilizados e ainda são os únicos responsáveis por achados de associação com significância estatística quanto ao TDAH. Assim, modelos animais e estudos bioquímicos implicaram genes do sistema serotoninérgico como bons candidatos a serem estudados no TDAH, e a mais célebre meta-análise deste transtorno forneceu forte suporte ao estudo do gene *HTR1B* (Gizer et al. 2009).

As diferentes comorbidades que comumente se manifestam representam um papel destacado na complexidade do espectro clínico dos pacientes. Como citado nos capítulos anteriores, as comorbidades podem ser incluídas na categoria de internalizantes ou externalizantes, sendo que mulheres mais frequentemente apresentam transtornos de natureza internalizante, enquanto homens tendem a manifestar a categoria externalizante de forma mais prevalente. Tais achados podem ser vinculados, na nomenclatura biológica, ao dimorfismo sexual. Apesar desse fator ter uma contribuição reconhecida na diferença de prevalência de determinados transtornos e de influenciar no curso sintomatológico observado entre homens e mulheres, ele não tem recebido a devida atenção nas análises, em particular nos estudos que testam a susceptibilidade genética. As diferenças observadas no perfil clínico de indivíduos com transtornos psiquiátricos podem ser reflexo de mecanismos etiológicos distintos. De fato, a abordagem de análise utilizada neste trabalho é um exemplo de que a seleção de grupos mais homogêneos, neste caso quanto ao sexo e por consequência de perfil de comorbidades, auxilia na detecção de sinais de

associação distintos, ligados a fatores genéticos nos subgrupos específicos. Na vida adulta, esta perspectiva considera a influência dos hormônios sexuais (que podem até mesmo alterar padrões de expressão de genes), excluindo um importante componente de heterogeneidade (Gobinath et al. 2017).

Apesar de diferentes estudos terem sugerido o sistema serotoninérgico como envolvido em diferentes transtornos psiquiátricos, inclusive no TDAH em crianças e em fenótipos relacionados, poucos trabalhos foram dedicados à análise do receptor de serotonina 5-HT<sub>1B</sub> em adultos com TDAH. Apesar da escassez generalizada de estudos com este receptor, um estudo foi capaz de reportar efeito dimórfico ao analisar diferentes polimorfismos do gene *HTR1B* (Conner et al. 2010). Nesse trabalho, ao analisar os SNPs rs11568817, rs130058, rs6296 e rs13212041, Conner et al. (2010) não observou nenhuma influência dos polimorfismos sobre o fenótipo de raiva e hostilidade na amostra total, porém, analisando separadamente por sexo foi possível observar efeito dos haplótipos de baixa expressão (aqueles que continham o alelo A para o rs1321204 em sua composição) com o fenótipo de raiva e hostilidade em homens. Tal associação não foi encontrada na amostra de mulheres. Apesar deste interessante achado, e de ser o único relato que até aquele momento sugeria efeito de dimorfismo sexual para o 5-HT<sub>1B</sub>, os autores não realizaram uma discussão sobre o sinal de efeito de dimorfismo sexual por eles capturado.

Na presente dissertação, apresentamos dados que corroboraram a associação dos alelos que foram majoritariamente considerados como de risco para diferentes transtornos em amostras caucasianas. Assim, apesar de não termos encontrado associação dos SNPs com o TDAH como desfecho, encontramos associações significativas do rs130058 – alelo T com risco aos transtornos por uso de substâncias e de álcool em homens e do rs6296 – alelo C como protetivo ao transtorno de ansiedade generalizada em mulheres. Porém, nosso resultado mais interessante certamente diz respeito ao rs11568817 – alelo G. Esse polimorfismo foi associado com transtorno por uso de substâncias e álcool em homens, enquanto que o mesmo alelo foi associado com transtorno de ansiedade generalizada em mulheres, além de ter



sido nominalmente associado com transtorno depressivo maior também em mulheres. Logo, verificamos que o mesmo alelo do rs11568817 do *HTR1B* pode estar relacionado aos transtornos externalizantes em homens e aos internalizantes em mulheres, da mesma forma que foi previamente descrito para o 5-HTTLPR – alelo S do gene *SLC6A4* (Gressier et al. 2016).

O fato de não termos encontrado associação deste polimorfismo com o TDAH em si (como foi observado em crianças – Gizer et al. 2009) remonta novamente à necessidade de pesquisar as variantes que foram implicadas ao transtorno em crianças de forma exploratória em adultos (por poderem ter etiologias distintas, como já comentado previamente). Desta forma, o presente trabalho ajuda a responder algumas perguntas, mas principalmente, traz à tona a necessidade de repensar o desenho de estudo. Isso porque, mesmo sendo o primeiro trabalho a ter analisado o gene do receptor de serotonina *HTR1B* pela perspectiva do efeito de dimorfismo sexual, obtivemos êxito em encontrar associações no subgrupo de homens e mulheres, as quais poderiam ter sido mascaradas em uma análise com ambos os sexos em um único grupo.

Concluindo, os presentes resultados se somam às variadas evidências de que o sexo pode ter um papel crucial nos estudos genéticos de associação, notadamente na psiquiatria.

## Bibliografia

- Achenbach, T. M., C. T. Howell, H. C. Quay, and C. K. Conners. 1991. "National Survey of Problems and Competencies among Four- to Sixteen-Year-Olds: Parents' Reports for Normative and Clinical Samples."
- American Psychiatric Association, APA. 2013. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - DSM-5*. Fifth Edit. Washington DC: American Psychiatric Association.
- Arnsten, Amy F. T. and Bao-ming Li. 2005. "Neurobiology of Executive Functions: Catecholamine Influences on Prefrontal Cortical Functions." *Biological Psychiatry* 57(11):1377–84.
- Ashare, Rebecca L., Catherine J. Norris, E. Paul Wileyto, John T. Cacioppo, and Andrew A. Strasser. 2013. "Individual Differences in Positivity Offset and Negativity Bias: Gender-Specific Associations with Two Serotonin Receptor Genes." *Personality and Individual Differences* 55(5):469–73.
- Banerjee, E. et al. 2006. "A Family-Based Study of Indian Subjects from Kolkata Reveals Allelic Association of the Serotonin Transporter Intron-2 (STin2) Polymorphism and Attention-Deficit-Hyperactivity Disorder (ADHD)." *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics: the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 141B(4):361–66.
- Banerjee, Emili and Krishnadas Nandagopal. 2015. "Does Serotonin Deficit Mediate Susceptibility to ADHD?" *Neurochemistry International* 82:52–68.
- Barkley, Russell A., Mariellen Fischer, Lori Smallish, and Kenneth Fletcher. 2006. "Young Adult Outcome of Hyperactive Children: Adaptive Functioning in Major Life Activities." *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry* 45(2):192–202.
- Barkley, Russell A., Kevin R. Murphy, George J. Dupaul, and Tracie Bush. 2002. "Driving in Young Adults with Attention Deficit Hyperactivity Disorder: Knowledge, Performance, Adverse Outcomes, and the Role of Executive Functioning." *Journal of the International Neuropsychological Society* 8:655–72.

- Barnes, Nicholas M. and Trevor Sharp. 1999. "A Review of Central 5-HT Receptors and Their Function." *Neuropharmacology* 38(8):1083–1152.
- Becker, Jill B. and Ming Hu. 2008. "Sex Differences in Drug Abuse." *Frontiers in Neuroendocrinology* 29(1):36–47.
- Biederman, Joseph, Stephen V Faraone, Michael C. Monuteaux, Marie Bober, and Elizabeth Cadogen. 2004. "Gender Effects on Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in Adults, Revisited." *Biological Psychiatry* 55(7):692–700.
- Biegon, Anat and Bruce McEwen. 1982. "Modulation by Estradiol of Serotonin Receptors in Brain." *The Journal of Neuroscience* 2(2):199–205.
- Brikell, Isabell, Ralf Kuja-halkola, and Henrik Larsson. 2015. "Heritability of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder in Adults." *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 168(B):406–13.
- Brookes, K. et al. 2006. "The Analysis of 51 Genes in DSM-IV Combined Type Attention Deficit Hyperactivity Disorder: Association Signals in DRD4, DAT1 and 16 Other Genes." *Molecular psychiatry* 11(10):934–53.
- Brunner, D. and René Hen. 1997. "Insights into the Neurobiology of Impulsive Behavior from Serotonin Receptor Knockout Mice." *Annals of the New York Academy of Sciences* 836(212):81–105.
- Cao, Jian, Emily LaRocque, and Dawie Li. 2013. "Associations of the 5-Hydroxytryptamine (Serotonin) Receptor 1B Gene (HTR1B) with Alcohol, Cocaine, and Heroin Abuse." *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* (2):169–76.
- Caye, Arthur et al. 2016. "Predictors of Persistence of ADHD into Adulthood: A Systematic Review of the Literature and Meta- analysis." *European Child & Adolescent Psychiatry* 25(11):1151–59.
- Chang, Zheng, Paul Lichtenstein, Philip J. Asherson, and Henrik Larsson. 2013. "Developmental Twin Study of Attention Problems." *JAMA Psychiatry* 70(3):311–18.
- Cigler, Tessa et al. 2001. "Novel and Previously Reported Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human 5-HT 1B Receptor Gene: No Association With

- Cocaine or Alcohol Abuse or Dependence.” *American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)* 105:489–97.
- Coleman, Mary. 1971. “Serotonin Concentrations in Whole Blood of Hyperactive Children.” *The Journal of Pediatrics* 78(6):985–90.
- Conner, Tamlin S. et al. 2010. “Functional Polymorphisms in the Serotonin 1B Receptor Gene (HTR1B) Predict Self-Reported Anger and Hostility Among Young Men.” *American journal of medical genetics* 156B(1):67–78.
- Contini, Verônica et al. 2012. “A Haplotype Analysis Is Consistent with the Role of Functional HTR1B Variants in Alcohol Dependence.” *Drug and Alcohol Dependence* 122(1–2):100–104.
- Cortese, Samuele. 2012. “The Neurobiology and Genetics of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD): What Every Clinician Should Know.” *European Journal of Paediatric Neurology* 16:422–33.
- Cupertino, Renata Basso et al. 2016. “SNARE Complex in Developmental Psychiatry: Neurotransmitter Exocytosis and beyond.” *Journal of Neural Transmission* 123:867–83.
- Curatolo, Paolo, Elisa D. Agati, and Romina Moavero. 2010. “The Neurobiological Basis of ADHD.” *Italian Journal of Pediatrics* 36:79–85.
- Curatolo, Paolo, Claudio Paloscia, Elisa D. Agati, Romina Moavero, and Augusto Pasini. 2009. “The Neurobiology of Attention Deficit/hyperactivity Disorder.” *European Journal of Paediatric Neurology* 13:299–304.
- Dalsgaard, Søren, Søren Dinesen Østergaard, James F. Leckman, Preben Bo Mortensen, and Marianne Giørtz Pedersen. 2015. “Mortality in Children, Adolescents, and Adults with Attention Deficit Hyperactivity Disorder: A Nationwide Cohort Study.” *Lancet* 385:2190–96.
- De La Fuente, Angelica, Shugao Xia, Craig Branch, and Xiaobo Li. 2013. “A Review of Attention-Deficit/hyperactivity Disorder from the Perspective of Brain Networks.” *Frontiers in human neuroscience* 7:1–8.
- Duan, J. et al. 2003. “Polymorphisms in the 5'-untranslated Region of the Human Serotonin Receptor 1B (HTR1B) Gene Affect Gene Expression.” *Molecular*

*psychiatry* 8:901–10.

- Edden, Richard A. E., Deana Crocetti, He Zhu, Donald L. Gilbert, and Stewart H. Mostofsky. 2012. "Reduced GABA Concentration in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder." *Archives of General Psychiatry* 69(7):750–53.
- Engel, G., M. Göthert, D. Hoyer, E. Schlicker, and K. Hillenbrand. 1986. "Identity of Inhibitory Presynaptic 5-Hydroxytryptamine (5-HT) Autoreceptors in the Rat Brain Cortex with 5-HTIB Binding Sites." *Archives of Pharmacology* 332:1–7.
- Faraone, Stephen V. et al. 2005. "Molecular Genetics of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder." *Biological Psychiatry* 57(11):1313–23.
- Faraone, Stephen V. 2006. "The Age-Dependent Decline of Attention Deficit Hyperactivity Disorder: A Meta-Analysis of Follow-up Studies." *Psychological Medicine* 36:159–65.
- Fayyad, J. et al. 2007. "Cross-National Prevalence and Correlates of Adult Attention-Deficit Hyperactivity Disorder." *British Journal of Psychiatry* 190:402–9.
- Fonseca, Dora J. et al. 2015. "Lack of Association of Polymorphisms in Six Candidate Genes in Colombian ADHD Patients." *Annals of neurosciences* 22(4):217–21.
- Forero, Diego A., Gonzalo H. Arboleda, Rafael Vasquez, and Humberto Arboleda. 2009. "Candidate Genes Involved in Neural Plasticity and the Risk for Attention-Deficit Hyperactivity Disorder: A Meta-Analysis of 8 Common Variants." *Journal of Psychiatry & Neuroscience* 34(5):361–66.
- Franke, B. et al. 2011. "The Genetics of Attention Deficit/hyperactivity Disorder in Adults, a Review." *Molecular Psychiatry* 17(10):960–87.
- Gainetdinov, Raul R. et al. 1999. "Role of Serotonin in the Paradoxical Calming Effect of Psychostimulants on Hyperactivity." 283:397–402.
- Garcia, C. R. et al. 2012. "The Burdened Life of Adults with ADHD: Impairment beyond Comorbidity." *European Psychiatry* 27:309–13.
- Gizer, Ian R., Courtney Ficks, and Irwin D. Waldman. 2009. "Candidate Gene Studies of ADHD: A Meta-Analytic Review." *Human Genetics* 126(1):51–90.
- Gobinath, Aarthi R., Elena Choleris, and Liisa A. M. Galea. 2017. "Sex, Hormones, and Genotype Interact To Influence Psychiatric Disease, Treatment, and

- Behavioral Research.” *Journal of Neuroscience Research* 95:50–64.
- Gressier, F., R. Calati, and A. Serretti. 2016. “5-HTTLPR and Gender Differences in Affective Disorders: A Systematic Review.” *Journal of Affective Disorders* 190:193–207.
- Guimarães, Ana P. et al. 2009. “Further Evidence for the Association between Attention Deficit/ Hyperactivity Disorder and the Serotonin Receptor 1B Gene.” *Journal of Neural Transmission* 116(12):1675–80.
- Guimarães, Ana Paula Miranda. 2006. “Estudo de Associação Com Genes Candidatos Do Sistema Serotoninérgico Em Crianças Afetadas Com O Transtorno de Déficit de Atenção E Hiperatividade ( TDAH ).” Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Hall, Frank Scott, Ichiro Sora, René Hen, and George R. Uhl. 2014. “Serotonin/Dopamine Interactions in a Hyperactive Mouse: Reduced Serotonin Receptor 1B Activity Reverses Effects of Dopamine Transporter Knockout.” *PLOS ONE* 9(12):1–20.
- Hartig, Paul R., Daniel Hoyer, Patrick P. A. Humprey, and Graeme R. Martin. 1996. “Alignment of Receptor Nomenclature with the Human Genome: Classification of 5-HT1B, and 5-HTID Receptor Subtypes.” *Trends in Pharmacological Sciences* 17:103–5.
- Hawi, Z. et al. 2002. “Serotonergic System and Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD): A Potential Susceptibility Locus at the 5-HT(1B) Receptor Gene in 273 Nuclear Families from a Multi-Centre Sample.” *Molecular psychiatry* 7(7):718–25.
- Heiser, P. et al. 2007. “Family-Based Association Study of Serotonergic Candidate Genes and Attention-Deficit/hyperactivity Disorder in a German Sample.” *Journal of Neural Transmission* 114(4):513–21.
- Hodes, Georgia E., Deena M. Walker, Benoit Labont, Eric J. Nestler, and Scott J. Russo. 2017. “Mini-Review Understanding the Epigenetic Basis of Sex Differences in Depression.” *Journal of Neuroscience Research* 95:692–702.
- Hoogman, Martine et al. 2017. “Subcortical Brain Volume Differences in Participants

- with Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Children and Adults: A Cross-Sectional Mega-Analysis.” *The Lancet Psychiatry* 17(1):1–10.
- Huang, Yung-yu et al. 2003. “Substance Abuse Disorder and Major Depression Are Associated with the Human 5-HT1B Receptor Gene (HTR1B) G861C Polymorphism.” *Neuropsychopharmacology* 28(1):163–69.
- Huang, Yung Yu, Régis Grailhe, Victoria Arango, René Hen, and J. John Mann. 1999. “Relationship of Psychopathology to the Human serotonin(1B) Genotype and Receptor Binding Kinetics in Postmortem Brain Tissue.” *Neuropsychopharmacology* 21(2):238–46.
- Ickowicz, Abel et al. 2007. “The Serotonin Receptor HTR1B: Gene Polymorphisms in Attention Deficit Hyperactivity Disorder.” *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics* 144B(1):121–25.
- Jensen, K. P. et al. 2009. “A Common Polymorphism in Serotonin Receptor 1B mRNA Moderates Regulation by miR-96 and Associates with Aggressive Human Behaviors.” *Molecular psychiatry* 14(4):381–89.
- Jin, H. et al. 1992. “Characterization of the Human.” *Journal of Biological Chemistry* 267(9):5735–38.
- Kapur, Shitji and Gary Remington. 1996. “Serotonin-Dopamine Interaction and Its Relevance to Schizophrenia.” *American Journal of Psychiatry* 153(4):466–76.
- Kent, L. et al. 2002. “Evidence That Variation at the Serotonin Transporter Gene Influences Susceptibility to Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD): Analysis and Pooled Analysis.” *Molecular psychiatry* 7(8):908–12.
- Kessler, Ronald C. 2003. “Epidemiology of Women and Depression.” *Journal of Affective Disorders* 74:5–13.
- Kessler, Ronald C. et al. 2006. “The Prevalence and Correlates of Adult ADHD in the United States : Results From the National Comorbidity Survey Replication.” *The American journal of psychiatry* 163(4):716–23.
- Kooij, J. J. Sandra et al. 2012. “Distinguishing Comorbidity and Successful Management of Adult ADHD.” *Journal of Attention Disorders* 16(5):3–19.
- Kunimura, Yuyu, Kinuyo Iwata, Norio Iijima, Makito Kobayashi, and Hitoshi Ozawa.

2015. "Effect of Sex Steroid Hormones on the Number of Serotonergic Neurons in Rat Dorsal Raphe Nucleus." *Neuroscience Letters* 594:127–32.
- Lara, Carmen et al. 2009. "Childhood Predictors of Adult Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: Results from the World Health Organization World Mental Health Survey Initiative." *Biological Psychiatry* 65:46–54.
- Lesch, Klaus Peter et al. 1996. "Association of Anxiety-Related Traits with a Polymorphism in the Serotonin Transporter Gene Regulatory Region." *Science* 274:1527–29.
- Li, Jun et al. 2005. "Serotonin 5-HT<sub>1B</sub> Receptor Gene and Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Chinese Han Subjects." *American Journal of Medical Genetics - Neuropsychiatric Genetics* 132:59–63.
- Li, Jun et al. 2007. "Association between Polymorphisms in Serotonin Transporter Gene and Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Chinese Han Subjects." *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 144B(1):14–19.
- Lu, Haiping, Mayumi Nishi, Ken-ichi Matsuda, and Mitsuhiro Kawata. 2004. "Estrogen Reduces the Neurite Growth of Serotonergic Cells Expressing Estrogen Receptors." *Neuroscience Research* 50:23–28.
- Lucki, Irwin. 1998. "The Spectrum of Behaviors Influenced by Serotonin." *Biological Psychiatry* 44(3):151–62.
- Madras, Bertha K., Gregory M. Miller, and Alan J. Fischman. 2005. "The Dopamine Transporter and Attention-Deficit/ Hyperactivity Disorder." *Biological Psychiatry* 57:1397–1409.
- Makris, Nikos, Joseph Biederman, Michael C. Monuteaux, and Larry J. Seidman. 2009. "Towards Conceptualizing a Neural Systems-Based Anatomy of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder." *Developmental Neuroscience* 31(0):36–49.
- Manor, I. et al. 2001. "Family-Based Association Study of the Serotonin Transporter Promoter Region Polymorphism (5-HTTLPR) in Attention Deficit Hyperactivity Disorder." *American journal of medical genetics* 105(1):91–95.



- Masellis, Mario et al. 2002. "Psychiatric Pharmacogenetics: Personalizing Psychostimulant Therapy in Attention-Deficit/hyperactivity Disorder." *Behavioural Brain Research* 130:85–90.
- Matte, B. et al. 2015. "ADHD in DSM-5: A Field Trial in a Large, Representative Sample of 18- to 19-Year-Old Adults." *Psychological Medicine* 45(2):361–73.
- Maura, Guido and Maurizio Raiteri. 1986. "Cholinergic Terminals in Rat Hippocampus Possess 5-HT<sub>1B</sub> Receptors Mediating Inhibition of Acetylcholine Release." *European Journal of Pharmacology* 129:333–37.
- Mccarthy, Margaret M. 2009. *Hormones, Brain and Behavior: Sexual Differentiation of the Brain: Mode, Mechanisms, and Meaning*. 2nd ed. edited by D. W. Pfaff. Academic Press.
- Mccarthy, Margaret M., Arthur P. Arnold, Gregory F. Ball, Jeffrey D. Blaustein, and Geert J. De Vries. 2012. "Sex Differences in the Brain : The Not So Inconvenient Truth." *The Journal of Neuroscience* 32(7):2241–47.
- Mekli, Krisztina et al. 2011. "The HTR1A and HTR1B Receptor Genes Influence Stress-Related Information Processing." *European Neuropsychopharmacology* 21:129–39.
- Merwood, A. et al. 2013. "Different Heritabilities but Shared Etiological Influences for Parent , Teacher and Self-Ratings of ADHD Symptoms : An Adolescent Twin Study." 5(2013):1973–84.
- Mick, Eric and Stephen V Faraone. 2008. "Genetics of Attention Deficit Hyperactivity Disorder." *Child Adolesc Psychiatric Clin N Am* 17:261–84.
- Mill, Jonathan et al. 2005. "Quantitative Trait Locus Analysis of Candidate Gene Alleles Associated with Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) in Five Genes: DRD4, DAT1, DRD5, SNAP-25, and 5HT<sub>1B</sub>." *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 133B(1):68–73.
- Mochizuki, Daisuke, Yuko Yuyama, Ryuichi Tsujita, Hisayuki Komaki, and Hitosi Sagai. 1992. "Cloning and Expression of the Human 5-HT<sub>1B</sub> Type Receptor Gene." *Biochemical and Biophysical Communications* 185(2):517–23.
- Moffitt, Terrie E. et al. 2015. "Is Adult ADHD a Childhood-Onset Neurodevelopmental

- Disorder? Evidence From a Four-Decade Longitudinal Cohort Study.” *American Journal of Psychiatry* 172(10):967–77.
- Neale, Benjamin M. et al. 2010. “Association Studies of Attention Deficit/Hyperactivity Disorder.” *Journal of American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 49(9):884–97.
- Nigg, Joel T. 2005. “Neuropsychologic Theory and Findings in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: The State of the Field and Salient Challenges for the Coming Decade.” *Biological Psychiatry* 57:1424–35.
- Nugent, Bridget M. et al. 2015. “Brain Feminization Requires Active Repression of Masculinization via DNA Methylation.” *Neuroscience* 18(5):690–700.
- Piñero-Diequez, Benjamín, Balanzá-Martínez, Pilar García-García, Begoña Soler-López, and CAT Study Group. 2016. “Psychiatric Comorbidity at the Time of Diagnosis in Adults With ADHD: The CAT Study.” *Journal of Attention Disorders* 20(12):1066–75.
- Quist, J. F. et al. 2003. “The Serotonin 5-HT1B Receptor Gene and Attention Deficit Hyperactivity Disorder.” *Molecular Psychiatry* 8:98–102.
- Quist, Jennifer F. and James L. Kennedy. 2001. “Genetics of Childhood Disorders : XXIII . ADHD , Part 7 : The Serotonin System.” *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry* 40(2):253–56.
- Rasmussen, Kirsten and Sten Levander. 2009. “Untreated ADHD in Adults Are There Sex Differences in Symptoms, Comorbidity, and Impairment?” *Journal of Attention Disorders* (353):353–60.
- Ratnu, Vikram S., Michael R. Emami, and Timothy W. Bredy. 2017. “Genetic and Epigenetic Factors Underlying Sex Differences in the Regulation of Gene Expression in the Brain.” *Journal of Neuroscience Research* 95:301–10.
- Retz, Wolfgang, Johannes Thome, Detlev Blocher, Miriam Baader, and Michael Rösler. 2002. “Association of Attention Deficit Hyperactivity Disorder-Related Psychopathology and Personality Traits with the Serotonin Transporter Promoter Region Polymorphism.” *Neuroscience Letters* 319:133–36.
- Ribasés, M. et al. 2009. “Exploration of 19 Serotonergic Candidate Genes in Adults

- and Children with Attention-Deficit/hyperactivity Disorder Identifies Association for 5HT2A, DDC and MAOB.” *Molecular psychiatry* 14:71–85.
- Rietveld, Cornelius A. et al. 2014. “Replicability and Robustness of GWAS for Behavioral Traits.” *Psychological Science* 25(11):1975–86.
- Rohde, Luis A. and Ricardo Halpern. 2004. “Transtorno de Déficit de Atenção / Hiperatividade : Atualização.” *Jornal de Pediatria* 80:61–70.
- Rucklidge, Julia J. 2010. “Gender Differences in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder.” *Psychiatric Clinics of North America* 33(2):357–73.
- Sari, Youssef. 2004. “Serotonin 1B Receptors: From Protein to Physiological Function and Behavior.” *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 28:565–82.
- Saudou, Frederic et al. 1994. “Enhanced Aggressive Behavior in Mice Lacking 5-HT1B Receptor.” *Science* 265:1875–78.
- Saul, Richard C. and C.Dennis Ashby. 1986. “Measurement of Whole Blood Serotonin as a Guide in Prescribing Psychostimulant Medication for Children with Attentional Deficits.” 189–95.
- Schuch, Jérôme J. J., Annelieke M. Roest, Willem A. Nolen, Brenda W. J. H. Penninx, and Peter De Jonge. 2014. “Gender Differences in Major Depressive Disorder: Results from the Netherlands Study of Depression and Anxiety.” *Journal of Affective Disorders* 156:156–63.
- Seedat, Soraya et al. 2009. “Cross-National Associations between Gender and Mental Disorders in the WHO World Mental Health Surveys.” *Archives of General Psychiatry* 66(7):785–95.
- Shafritz, Keith M. et al. 2004. “The Effects of Methylphenidate on Neural Systems of Attention in Attention Deficit Hyperactivity Disorder.” *American Journal of Psychiatry* 161:1990–97.
- Simon, Viktória, Pál Czobor, Sára Bálint, Ágnes Meszáros, and István Bitter. 2009. “Prevalence and Correlates of Adult Attention-Deficit Hyperactivity Disorder: Meta-Analysis.” *The British Journal of Psychiatry* 194:204–11.
- Sinha, Rashmi, C.Robert Cloninger, and Abbas Parsian. 2003. “Linkage Disequilibrium and Haplotype Analysis Between Serotonin Receptor 1B Gene

- Variations and Subtypes of Alcoholism.” *American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)* 121B:83–88.
- Smoller, Jordan W. et al. 2006. “Association between the 5HT1B Receptor Gene (HTR1B) and the Inattentive Subtype of ADHD.” *Biological psychiatry* 59(5):460–67.
- Sobanski, E. et al. 2007. “Psychiatric Comorbidity and Functional Impairment in a Clinically Referred Sample of Adults with Attention-Deficit/hyperactivity Disorder (ADHD).” *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 257:371–77.
- Spencer, Thomas J., Joseph Biederman, and Eric Mick. 2007. “Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: Diagnosis, Lifespan, Comorbidities, and Neurobiology.” *Ambulatory Pediatrics* 7:73–81.
- Spivak, B. et al. 1999. “Circulatory Levels of Catecholamines, Serotonin and Lipids in Attention Deficit Hyperactivity Disorder.” *Acta Psychiatrica Scandinavica* 99:300–304.
- Steinhausen, Hans-christoph. 2009. “The Heterogeneity of Causes and Courses of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder.” *Acta Psychiatrica Scandinavica* 120:392–99.
- Sterley, Toni-lee, Fleur M. Howells, and Vivienne A. Russell. 2013. “Maternal Separation Increases GABA A Receptor-Mediated Modulation of Norepinephrine Release in the Hippocampus of a Rat Model of ADHD, the Spontaneously Hypertensive Rat.” *Brain Research* 1497:23–31.
- Swanson, J. M. and N. D. Volkow. 2003. “Serum and Brain Concentrations of Methylphenidate : Implications for Use and Abuse.” 27:615–21.
- Swanson, James M. et al. 2007. “Etiologic Subtypes of Attention-Deficit/ Hyperactivity Disorder: Brain Imaging , Molecular Genetic and Environmental Factors and the Dopamine Hypothesis.” *Neuropsychology Review* 17:39–59.
- Tripp, Gail and Jeffery R. Wickens. 2009. “Neurobiology of ADHD.” *Neuropharmacology* 57:579–89.
- Tsai, S. J. et al. 2004. “Association Study of Serotonin 1B Receptor (A--161T )

- Genetic Polymorphism and Suicidal Behaviors and Response to Fluoxetine in Major Depressive Disorder.” *Neuropsychobiology* 50(3):235–38.
- Volkow, Nora D. et al. 2001. “Therapeutic Doses of Oral Methylphenidate Significantly Increase Extracellular Dopamine in the Human Brain.” *The Journal of Neuroscience* 21:1–5.
- Wang, Shan et al. 2009. “An Association Study of the Serotonin Transporter and Receptor Genes with the Suicidal Ideation of Major Depression in a Chinese Han Population.” *Psychiatry Research* 170:204–7.
- Weiss, Lauren A., Mark Abney, Edwin H.Jr Cook, and Carole Ober. 2005. “Sex-Specific Genetic Architecture of Whole Blood Serotonin Levels.” *American journal of Human Genetics* 76:33–41.
- Weissman, Myrna M., Philip J. Leaf, Charles E. Holzer, Jerome K. Myers, and Gary L. Tischler. 1984. “The Epidemiology of Depression An Update on Sex Differences in Rates.” *Journal of Affective Disorders* 7:179–88.
- Wilens, Timothy E., Stephen V. Faraone, and Joseph Biederman. 2004. “Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in Adults.” *JAMA* 292(5):619–23.
- Willcutt, Erik G. 2012. “The Prevalence of DSM-IV Attention-Deficit / Hyperactivity Disorder : A Meta-Analytic Review.” *Neurotherapeutics* 9:490–99.
- Wu, Jason B. et al. 2009. “Regulation of Monoamine Oxidase A by the SRY Gene on the Y Chromosome.” *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23(11):4029–38.
- Xu, X. et al. 2008. “No Association between Two Polymorphisms of the Serotonin Transporter Gene and Combined Type Attention Deficit Hyperactivity Disorder.” *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 147B(7):1306–9. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18452186>).
- Zai, Gwyneth et al. 2016. “Rapporteur Summaries of Plenary, Symposia, and Oral Sessions from the XXIIIrd World Congress of Psychiatric Genetics Meeting in Toronto, Canada, 16 – 20 October 2015.” *Psychiatric Genetics* 26:229–57.
- Zhang, Kerang, Qi Xu, Yong Xu, Hong Yang, and Jinxiu Luo. 2009. “The Combined

Effects of the 5-HTTLPR and 5-HTR1A Genes Modulates the Relationship between Negative Life Events and Major Depressive Disorder in a Chinese Population.” *Journal of Affective Disorders* 114:224–31.

Zoroglu, S.S., Erdal, M.E., Alasehirli, B., Erdal, N., Sivasli, E., Tutkun, H., et al., 2002. Significance of serotonin transporter gene 5-HTTLPR and variable number of tandem repeat polymorphism in attention-deficit-hyperactivity disorder. *Neuropsychobiology* 45, 176–181.

Zupanc, Tomaž, Peter Pregelj, Martina Tomori, Radovan Komel, and Alja Videti. 2010. “No Association between Polymorphisms in Four Serotonin Receptor Receptors Genes, Serotonin Transporter Gene and Alcohol Related Suicide.” *Psychiatria Danubina* 22(4):522–27.



## 1. Aprovação do comitê de ética do HCPA



### HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

#### RESOLUÇÃO

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

**Projeto:** 01-321

**Versão do Projeto:** 22/01/2002

**Versão do TCLE:** 22/01/2002

**Pesquisadores:**

PAULO SILVA BELMONTE DE ABREU

CLAITON H. O. BAU

EUGENIO GREVET

CARLOS ALBERTO IGLESIAS SALGADO

BETINA CHAIT

**Título:** ESTUDO DAS BASES MOLECULARES DO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO/HIPERATIVIDADE EM ADULTOS

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA.

Por pertencer a uma área temática especial este projeto somente poderá ser iniciado após a sua aprovação pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Porto Alegre, 25 de janeiro de 2002.

Profa. Themis Reverbel da Silveira  
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA