

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**AUSÊNCIA DE ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NO GENE DO
RECEPTOR 1B DE SEROTONINA (*HTR1B*) E O TRANSTORNO DE DÉFICIT
DE ATENÇÃO/ HIPERATIVIDADE EM ADULTOS**

Leandro Leal de Lima

Orientação: Professor Dr. Claiton H. D. Bau

Co-orientação: Dra. Verônica Contini

**Trabalho de Conclusão de curso apresentado
ao Instituto de Biociências – UFRGS, como
requisito parcial para a obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas**

Porto Alegre, novembro de 2011.

O presente trabalho de conclusão de curso foi realizado no Laboratório de DNA do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e será apresentado na forma de artigo científico. O artigo está em preparação para submissão ao *Journal of Neural Transmission* (instruções em anexo).

As pesquisas foram financiadas pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto do Milênio, Programa a Núcleos de Excelência (PRONEX, Brasil) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS – DECIT/PPSUS, Brasil).

AGRADECIMENTOS

Após todos esses anos e um longo caminho desde o vestibular até a entrega deste trabalho de conclusão, alguns agradecimentos se fazem necessários:

Primeiro, agradeço aos meus pais por toda a paciência em me agüentar – tarefa hercúlea por si só – e também por todo o apoio e carinho.

Aos amigos que fiz durante o curso, que vieram de brinde com a vaga na UFRGS e se tornaram o prêmio inestimável que levo junto com meu diploma, companheiros de tantos momentos alegres e outros tantos difíceis (incluindo esse TCC) com os quais sempre pude contar. E devo um agradecimento especial para a May Pasquetti, sem ela minhas apresentações seriam mais feias, meus pôsteres mais mal feitos, minhas notas piores e esses cinco anos de faculdade mais chatos.

Aos meus colegas do Departamento de Genética, principalmente os da sala 109, por sempre estarem dispostos a tirar minhas dúvidas, meus PCRs, explicar procedimentos, além de compartilhar boas risadas (e comida).

Ao meu orientador, prof. Claiton Bau, por me incentivar e ajudar ao longo de todo o período em que fui seu IC.

A minha co-orientadora, Dra. Verônica Contini, com quem sempre pude contar durante toda a minha iniciação científica e, principalmente, nessa difícil reta final do TCC, agradeço por toda a dedicação e presteza.

Por fim, a Dra. Júlia Genro e a prof. Lavinia Schüler, por aceitarem fazer parte da minha banca nesse trabalho.

Ausência de Associação entre Polimorfismos no Gene do Receptor 1B de Serotonina (*HTR1B*) e o Transtorno de Déficit de Atenção/ Hiperatividade em Adultos

Leandro L. de Lima¹, Verônica Contini², Guilherme P. Bertuzzi¹, Nina R. Mota¹,
Eduardo S. Vitola², Paula O. G. da Silva², Carlos A. I. Salgado², Eugênio H. Grevet²,
Paulo B. de Abreu^{2,3}, Luís A. Rohde^{2,3}, Claiton H. D. Bau^{1,2}

¹ Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

² Programa de Déficit de Atenção/ Hiperatividade em adultos, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Departamento de Psiquiatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Autor para correspondência:

Dr. Claiton H. D. Bau, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Caixa Postal: 15053, CEP: 91501-970.

Email: claiton.bau@ufrgs.br

Telephone: (5551) 3308-6718

Fax: (5551) 3308-7311

RESUMO

O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) é bastante comum e caracteriza-se por sintomas acentuados de desatenção e/ou hiperatividade, que iniciam na infância e persistem na vida adulta na maioria dos casos. Sabe-se que alterações na quantidade de serotonina (5-HT) podem resultar em mudanças comportamentais em humanos, muitas vezes relacionadas com comportamentos impulsivos e agressivos. Entre os genes envolvidos na rota serotoninérgica, o gene do receptor de serotonina 1B (*HTR1B*) tem recebido uma atenção especial, pois estudos em modelos animais sem um receptor 1B revelaram várias características de comportamentos associadas com distúrbios psiquiátricos. Além disso, estudos de associação também têm revelado associações positivas entre polimorfismos no gene e transtornos externalizantes, tais como dependência de álcool e o TDAH. O presente estudo tem como objetivo investigar o papel dos polimorfismos mais relevantes do gene *HTR1B* (rs11568817, rs130058 e rs6296 e rs13212041) na predisposição genética ao TDAH em adultos. A amostra foi composta por 514 adultos com TDAH e 618 controles. Pacientes e controles não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nas frequências genotípicas e alélicas em nenhum dos polimorfismos. Também não foram encontradas diferenças significativas para as frequências haplotípicas entre casos e controles. Concluindo, não encontramos em nosso estudo associações envolvendo o gene *HTR1B* e o TDAH em adultos.

Palavras-chave: TDAH, *HTR1B*, serotonina, associação, adultos.

INTRODUÇÃO

O Transtorno de Déficit de Atenção/ Hiperatividade (TDAH) caracteriza-se por sintomas de desatenção, impulsividade e hiperatividade, que são mais frequentes e severos do que o observado e esperado em indivíduos com nível de desenvolvimento semelhante (Purper-Ouakil et al. 2011). Estudos de meta-análise indicam uma prevalência de 5,3% para o transtorno em crianças e adolescentes (Polanczyk et al. 2007) e de 2,5% em adultos (Simon et al. 2009).

Numerosas evidências confirmam que a contribuição genética no TDAH é substancial e diversos genes dos sistemas de neurotransmissão têm sido implicados no desenvolvimento do transtorno (Purper-Ouakil et al. 2011). Os resultados mais consistentes, provenientes de estudos de meta-análise, apontam resultados significativos para o gene do receptor 1B de serotonina (*HTR1B*), entre outros (Gizer et al. 2009; Faraone e Mick, 2010). De fato, estudos realizados em indivíduos da nossa população confirmam o envolvimento de polimorfismos do gene *HTR1B* na predisposição ao TDAH em crianças (Guimarães et al. 2009) e à dependência de álcool (Contini et al. 2011).

O *HTR1B* é um gene sem íntrons, localizado no braço longo do cromossomo 6 (6q13) (Jin et al. 1992). A expressão do gene é elevada no núcleo dorsal da rafe, região do cérebro envolvida no ciclo do sono, sendo também expresso em quantidades menores no corpo estriado e no córtex prefrontal dorsolateral (Ichikawa et al. 2005). O receptor apresenta funções distintas dependendo de sua localização: no córtex frontal acredita-se que ele atue como um receptor terminal, inibindo a secreção de dopamina; já no corpo estriado e nos gânglios da base ele atua como um auto-receptor pré-sináptico, inibindo a liberação de serotonina (Pytliak et al. 2010). Estudos realizados em animais sem um receptor *HTR1B* (*knock-out*) revelaram várias características de comportamento associadas com distúrbios psiquiátricos, tais como aumento na agressividade e impulsividade, diminuição da ansiedade e aumento no consumo de álcool e cocaína (Brunner e Hen, 1997; Sanders et al. 2002). Diversos estudos realizados com humanos parecem comprovar esses achados, sendo encontradas associações entre o *HTR1B* e comportamentos agressivos, abuso de substâncias e dependência de álcool (Kranzler et al. 2002; Huang et al. 2002; Proudnikov et al. 2005; Jensen et al. 2009; Conner et al. 2010; Hu et al. 2010; Contini et al. 2011).

Entre os polimorfismos mais investigados no *HTR1B* destacam-se o T-261G (rs11568817) e o A-161T (rs130058), ambos localizados na região promotora do gene, visto que estudos de funcionalidade *in vitro* sugerem que os dois polimorfismos afetam a atividade transcricional do gene (Duan et al. 2003). Além destes, o G861C (rs6296) também tem sido intensivamente investigado, embora nenhum efeito funcional direto deste polimorfismo tenha sido descrito. No entanto, diversos estudos têm demonstrado que os três polimorfismos (rs11568817, rs130058 e rs6296) estão em desequilíbrio de ligação e devem ser analisados em conjunto (Huang et al. 1999; Sanders et al. 2001; Cigler et al. 2001; Kranzler et al. 2002; Duan et al. 2003). No que diz respeito ao TDAH foram realizados vários estudos de associação envolvendo os polimorfismos do gene, em especial o rs6296, para o qual há uma associação significativa do alelo G em uma meta-análise recente (Gizer et al. 2009).

Recentemente, foram encontradas evidências de que um polimorfismo localizado na região 3'UTR do gene, o A1997G (rs13212041), poderia estar envolvido na modulação da expressão gênica, sendo alvo de repressão por silenciamento direto via micro-RNA (Jensen et al. 2009). Verificou-se que indivíduos portadores do alelo A do polimorfismo rs13212041 apresentam expressão reduzida de *HTR1B* e maior propensão a comportamentos agressivos (Jensen et al. 2009; Conner et al. 2010). Ainda não houve uma análise envolvendo esse polimorfismo e o TDAH, e a sua inclusão em um estudo de haplótipos poderia ajudar a compreender a variação funcional dentro do gene.

Assim, é importante que se realizem mais estudos para ajudar a compreender o funcionamento desses polimorfismos em relação ao seu papel na susceptibilidade ao TDAH, em especial em indivíduos adultos. O objetivo principal do presente trabalho é investigar as possíveis associações entre os polimorfismos mais importantes do gene *HTR1B* (rs11568817, rs130058 e rs6296 e rs rs13212041) e a predisposição genética ao TDAH em adultos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

A amostra de casos foi composta por 514 adultos com TDAH, diagnosticados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), de acordo com os critérios do Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais da associação Norte-Americana de Psiquiatria (DSM-IV) (APA, 1994). Os critérios de inclusão foram: a) os indivíduos devem ser descendentes de europeus; b) maiores de 18 anos e c) capazes de discernir se querem participar do estudo. Foram critérios de exclusão: a) quociente de Inteligência (QI) abaixo de 70; b) presença de doenças neurológicas e c) diagnóstico de psicose ou demência.

O grupo controle foi composto por 618 doadores de sangue do HCPA, pareados quanto ao sexo, nível socioeconômico e etnia. Os critérios de inclusão e exclusão foram os mesmos aplicados a amostra de casos. Os voluntários foram avaliados quanto à presença de TDAH através da aplicação da Escala de Auto-avaliação para o Diagnóstico de TDAH em Adultos (ASRS-V1.1, Organização Mundial da Saúde).

Todos os indivíduos incluídos no estudo (pacientes e controles) assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido para a realização dos estudos propostos. Os protocolos foram aprovados pelos comitês de ética do HCPA e da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Procedimentos Diagnósticos

Os procedimentos diagnósticos dos pacientes nesta amostra já foram extensivamente descritos (Grevet et al. 2005, 2006; Fisher et al. 2007; Karam et al. 2009). Resumidamente, os diagnósticos de TDAH e de outras comorbidades psiquiátricas foram realizados através das seguintes entrevistas semi-estruturadas: 1) K-SADS-E (*Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children - Epidemiologic Version*), adaptada para adultos, para os diagnósticos de TDAH e do Transtorno de Oposição Desafiante (TOD); 2) SCID-V (*Structured Clinical Interview for DSM-IV*), para o diagnóstico de comorbidades de Eixo-1 e 3) M.I.N.I (*Mini International Neuropsychiatric Interview*), para os diagnósticos de Transtorno de Conduta (TC) e Transtorno de Personalidade Antissocial (TPAS).

Os pacientes também foram avaliados quanto à gravidade dos sintomas de TDAH e de TOD através da aplicação de escalas objetivas SNAP-IV (*Swanson, Nolan, and Pelham scale - version IV*). Os subtestes cubos e vocabulário da escala Wechsler de Inteligência para adultos (*WAIS-R- Wechsler Adult Intelligence Scale—Revised*) foram utilizados para a determinação do QI estimado.

Métodos laboratoriais

A extração de DNA de pacientes e controles foi realizada através de uma adaptação do método de Lahiri e Nurnberger (1991). A amplificação dos polimorfismos rs130058 e rs6296 foi realizada através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), segundo as condições descritas em Guimarães et al. (2010). Os polimorfismos rs11568817 e rs13212041 foram genotipados através do sistema de discriminação alélica *Taqman SNP genotyping assays (Applied Biosystems)*, de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante.

A avaliação do desequilíbrio de ligação (DL) entre os polimorfismos rs11568817, rs130058, rs6296 e rs13212041, em pacientes e controles, e a estimativa dos haplótipos foram realizadas através do programa MLOCUS (*Multiple Locus Haplotype software*) (Long et al. 1999).

Análise estatística

A comparação das frequências alélicas, genótípicas e haplotípicas entre casos e controles foi realizada através do teste do qui-quadrado. A análise do efeito dos polimorfismos em variáveis clínicas da amostra de pacientes foi realizada através do teste do qui-quadrado, para variáveis qualitativas (presença de comorbidades), e do teste ANOVA, para variáveis quantitativas (gravidade dos sintomas e escores de QI estimado). A correção para comparações múltiplas foi realizada pelo método de Bonferroni, sendo que a significância foi estabelecida em $p < 0,006$.

RESULTADOS

A amostra de casos foi composta por 51,2% de homens e 48,8% de mulheres, com idade média de 33,8 anos. Na amostra controle, 49,3% eram homens e 50,7% mulheres, com idade média de 29,1 anos.

As distribuições genótípicas dos quatro polimorfismos analisados (rs11568817, rs130058, rs6296 e rs13212041), em casos e controles, encontram-se de acordo com o esperado para o equilíbrio de Hardy–Weinberg. Pacientes e controles não apresentaram diferenças estatisticamente significadas nas frequências genótípicas e alélicas em nenhum dos polimorfismos. As frequências genótípicas e alélicas, em pacientes e controles estão descritas na Tabela 1.

A análise haplotípica revelou que os quatro polimorfismos encontram-se em DL, em pacientes e controles. Os valores do DL obtidos em pacientes foram: rs11568817-rs130058 $D'=0,88$, $p<0,001$; rs11568817-rs6296 $D'=0,91$, $p<0,001$; rs11568817-rs13212041 $D'=0,88$, $p<0,001$; rs130058-rs6296 $D'=0,95$, $p<0,001$; rs130058-rs13212041 $D'=0,98$, $p<0,001$; rs6296-rs13212041 $D'=0,92$, $p<0,001$. Na amostra controle os valores foram bastante semelhantes. Os haplótipos estimados em pacientes e controles estão descritos na Tabela 2.

Não foram observados efeitos significativos de nenhum dos polimorfismos ou haplótipos nas variáveis clínicas dos pacientes com TDAH (presença de comorbidades, gravidade dos sintomas e escores de QI estimado).

DISCUSSÃO

Nossos resultados sugerem que não há uma associação direta entre os polimorfismos e haplótipos do gene *HTR1B* com a susceptibilidade ao desenvolvimento de TDAH em adultos. Da mesma forma, também não detectamos nenhum efeito do *HTR1B* em variáveis clínicas dos pacientes, como a presença de comorbidades e a gravidade do transtorno.

Recentemente, um estudo feito pelo nosso grupo - analisando os mesmos polimorfismos do *HTR1B* e tendo por base a mesma população - encontrou uma associação entre o gene e o alcoolismo. Foi verificado que dois haplótipos contendo o par G/A para os polimorfismos rs11568817 e rs130058 apresentavam uma frequência significativamente maior em pacientes (Contini et al. 2011). Sabe-se que o TDAH está relacionado com transtornos por uso de substâncias (Iacono et al. 2008; Young et al. 2009), sendo provável que alguns fatores genéticos de risco sejam compartilhados. No entanto, como é possível observar pelos resultados obtidos no presente estudo, tal tendência não se mostrou evidente nas análises envolvendo o *HTR1B* e o TDAH.

Os resultados mostrados nesse trabalho, tanto no que se refere às análises alélicas quanto às análises haplotípicas, não confirmam os achados encontrados para o TDAH nos estudos anteriores (Hawi et al. 2002; Quist et al. 2003; Li et al. 2005; Snoller et al. 2006). No entanto, estão de acordo com o encontrado em outros dois estudos: na análise feita por Ickowicz et al. (2007), envolvendo 6 polimorfismos do *HTR1B* e utilizando uma amostra composta por 203 famílias, os autores não encontraram qualquer associação entre o gene e o TDAH, tanto no teste de desequilíbrio de transmissão quanto na análise de haplótipos; já no estudo realizado por Ribases et al. (2007), foram analisados 19 genes envolvidos na neurotransmissão serotoninérgica em uma amostra de pacientes com TDAH, sendo analisados separadamente crianças e adultos, onde o *HTR1B* novamente não se mostrou associado ao TDAH.

Não se pode excluir a possibilidade de que a heterogeneidade clínica e etiológica do TDAH possa ter um papel nessas disparidades entre os resultados. O *HTR1B*, por exemplo, já se mostrou positivamente associado com o TDAH em uma meta-análise (Gizer et al. 2009), sendo essa associação vista também em crianças da nossa população (Guimarães et al. 2009); porém, estudos farmacológicos não demonstram associação entre o gene e o tratamento com metilfenidato (um dos principais fármacos disponíveis para o tratamento do TDAH), nem mesmo em crianças (Zeni et al. 2007). O transtorno apresenta diferentes subtipos e doenças psiquiátricas associadas, além de uma grande variabilidade na gravidade, na persistência dos sintomas ao longo da vida e nas taxas de prevalência entre os sexos. Isso sugere que o TDAH seja um fenótipo complexo, sobre o qual devem atuar diferentes fatores genéticos e ambientais (Stergiakouli et al. 2010; Wallis et al. 2010; Wilens et al. 2010; Purper-Ouakil et al. 2011).

Também podemos levar em consideração que as associações encontradas em estudos com crianças talvez se devam a situações de externalização mais evidentes. Sabe-se que na infância o TDAH é aproximadamente duas vezes mais comum em meninos do que em meninas, assim como é sabido que os transtornos disruptivos do comportamento são mais frequentes no sexo masculino (Polanczyk e Jensen, 2008). A presença desses transtornos faz com que o TDAH se torne, de certa forma, mais “evidente” em meninos, facilitando o diagnóstico. Ao contrário, as meninas com TDAH apresentam predomínio dos sintomas de desatenção, causando menos incômodo às famílias e à escola e sendo, portanto, menos encaminhadas ao tratamento (Rohde e Halpern, 2004; Biederman et al. 2004; Stergiakouli e Thapar, 2010). Já na vida adulta, acredita-se que as próprias mulheres com TDAH tendem a buscar tratamento, o que,

conseqüentemente, acaba refletindo em uma distribuição mais balanceada entre os sexos (Biederman et al. 2004). Dessa forma, é possível que uma amostra de adultos acabe englobando um maior número de indivíduos com um fenótipo mais leve do transtorno, tendo os estudos feitos com crianças de certa maneira “concentrado” indivíduos com fenótipos mais graves, o que reforçaria a possibilidade de uma associação positiva. Isso poderia explicar o porquê das associações positivas com o gene encontradas em estudos utilizando amostras de crianças com TDAH.

Concluindo, nosso estudo não mostra associações entre o gene *HTR1B* e o TDAH em adultos. A interpretação desses resultados em conjunto com as evidências disponíveis na literatura sugere que o papel dos polimorfismos e haplótipos estudados possa ser mais relevante na predisposição a fenótipos vinculados a externalização no sexo masculino, tal como o TDAH em crianças ou o alcoolismo em adultos.

Referências Bibliográficas

American Psychiatric Association (1994). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition. American Psychiatric Association. Washington.

Biederman J (2004). Impact of comorbidity in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychiatry* 65 Suppl 3: 3-7.

Brunner D and Hen R (1997). Insights into the neurobiology of impulsive behavior from serotonin receptor knockout mice. *Annals of the New York Academy of Sciences* 836, 81–103.

Cigler T, LaForge KS, McHugh PF, Kappadia SU, Leal SM, Kreek MJ (2001). Novel and previously identified single nucleotide polymorphisms in the human 5-HT1B receptor gene: no association with cocaine or alcohol abuse/dependence. *American Journal Medical Genetics* 105:489-497

Contini, V, et al., A haplotype analysis is consistent with the role of functional HTR1B variants in alcohol dependence. *Drug Alcohol Depend.* (2011). doi:10.1016/j.drugalcdep.2011.09.020

Conner TS, Jensen KP, Tennen H, Furneaux HM, Kranzler HR, 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 Part B* 153B:67–78.

Duan J, Sanders AR, Molen JE, Martinolich L, Mowry BJ, Levinson DF, Crowe RR, Silverman JM, Gejman PV (2003). Polymorphisms in the 5'-untranslated region of the human serotonin receptor 1B (HTR1B) gene affect gene expression. *Molecular Psychiatry*. 8:901-910.

Faraone SV e Mick E (2010). Molecular genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr Clin North Am* 33: 159-180.

Fischer AG, Bau C.H., Grevet EH, Salgado CA, Victor MM, Kalil KL, Sousa NO, Garcia CR e Belmonte-de-Abreu P (2007). The role of comorbid major depressive disorder in the clinical presentation of adult ADHD. *J Psychiatr Res* 41: 991-996.

Gizer IR, Ficks C e Waldman ID (2009). Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet* 126: 51-90.

Guimaraes AP, Schmitz M, Polanczyk GV, Zeni C, Genro J, Roman T, Rohde LA, Hutz MH (2009). Further evidence for the association between attention deficit/hyperactivity disorder and the serotonin receptor 1B gene. *J Neural Transm.* 116, 1675-1680.

Grevet EH, Bau CH, Salgado CA, Fischer AG, Kalil K, Victor MM, Garcia CR, Sousa NO, Rohde LA e Belmonte-de-Abreu P (2006). Lack of gender effects on subtype outcomes in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: support for the validity of subtypes. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 256: 311-319.

Grevet EH e Rohde LA (2005). Diretrizes e algoritmo para o tratamento do transtorno de déficit de atenção/hiperatividade na infância, adolescência e vida adulta. In: Cordioli, AV. Psicofármacos: consulta rápida, 3ª ed. Artmed. Porto Alegre, RS.

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 e Gill M (2002). Serotonergic system and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): a potential susceptibility locus at the 5-HT1B receptor gene in 273 nuclear families from a multi-centre sample. *Mol Psychiatry*. 718-725.

Hu J, Henry S, Gallezot JD, Ropchan J, Neumaier JF, Potenza MN, Sinha R, Krystal JH, Huang Y, Ding YS, Carson RE, Neumeister A, (2010). Serotonin 1B receptor imaging in alcohol dependence. *Biol Psychiatry*. 67, 800-803.

Huang YY, Grailhe R, Arango V, Hen R, Mann JJ, (1999). Relationship of psychopathology to the human serotonin1B genotype and receptor binding kinetics in postmortem brain tissue. *Neuropsychopharmacology*. 21, 238-246.

Huang YY, Oquendo MA, Friedman JM, Greenhill LL, Brodsky B, Malone KM, Khait V, Mann JJ, (2003). Substance abuse disorder and major depression are associated with the human 5-HT1B receptor gene (HTR1B) G861C polymorphism. *Neuropsychopharmacology*. 28, 163-169.

Iacono WG, Malone SM e McGue M (2008). Behavioral disinhibition and the development of early-onset addiction: common and specific influences. *Annu Rev Clin Psychol* 4: 325-348.

Ichikawa M, Okamura-Oho Y, Okunishi R, Kanamori M, Suzuki H, Ritani A, Nitta H, Eguchi N, Urade Y, Hayashizaki Y (2005) Expression analysis of genes responsible for serotonin signaling in the brain. *Neurobiol Dis* 19:378–385

Ickowicz A, Feng Y, Wigg K, Quist J, Pathare T, Roberts W, Malone M, Schachar R, Tannock R, Kennedy JL, Barr CL. (2007). The Serotonin Receptor HTR1B: Gene Polymorphisms in Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Am J Med Genet Part B* 144B:121–125.

Jensen KP, Covault J, Conner TS, Tennen H, Kranzler HR., Furneaux HM (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.

Jin H, Oksenberg D, Ashkenazi A, Peroutka SJ, Duncan AM, Rozmahel R, Yang Y et al. (1992). Characterization of the human 5-hydroxytryptamine1B receptor. *J. Biol. Chem*. 267: 5735–5738.

Kranzler HR, Hernandez-Avila CA, Gelernter J, (2002). Polymorphism of the 5-HT1B receptor gene (HTR1B): strong within-locus linkage disequilibrium without association to antisocial substance dependence. *Neuropsychopharmacology*. 26, 115-122.

Karam RG, Bau CH, Salgado CA, Kalil KL, Victor MM, Sousa NO, Vitola ES, Picon FA, Zeni GD, Rohde LA, Belmonte-de-Abreu P, Grevet EH (2009) Late-onset ADHD in adults: milder, but still dysfunctional. *J Psychiatr Res* 43(7):697-701

Lahiri DK, Nurnberger JI. (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research*. 19:5444.

Li J, Wang Y, Zhou R, Zhang H, Yang L, Wang B, Khan S, Faraone SV. *Am J* (2005) Serotonin 5-HT1B receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder in Chinese Han subjects. *Med Genet B Neuropsychiatr Genet* :59-63.

Purper-Ouakil D, Ramoz N, Lepagnol-Bestel AM, Gorwood P, Simonneau M (2011) Neurobiology of attention deficit/hyperactivity disorder. *Pediatr Res* 69(5 Pt 2):69R-76R

Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, Biederman J e Rohde LA (2007). The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry* 164: 942-948.

Polanczyk G e Jensen P (2008). Epidemiologic considerations in attention deficit hyperactivity disorder: a review and update. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 17: 245-260, vii.

Proudnikov D, LaForge KS, Hofflich H, Levenstien M, Gordon D, Barral S, Ott J, Kreek MJ, (2006). Association analysis of polymorphisms in serotonin 1B receptor (HTR1B) gene with heroin addiction: a comparison of molecular and statistically estimated haplotypes. *Pharmacogenet Genomics*. 16: 25-36.

Pytliak M, Vargová V, Mechírová V, Felšöci M. (2011). Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications. *Physiol Res*.;60(1):15-25.

Quist JF, Barr CL, Schachar R, Roberts W, Malone M, Tannock R, Basile VS, Beitchman J, Kennedy JL. (2003). The serotonin 5-HT1B receptor gene and attention déficit hyperactivity disorder *Mol Psychiatry*: 98-102.

Rohde LA e Halpern R (2004). Recent advances on attention deficit/hyperactivity disorder. *J Pediatr (Rio J)* 80: S61-70.

Ribasés M, Ramos-Quiroga JA, Hervás A, Bosch R, Bielsa A, Gastaminza X, Artigas J, Rodríguez-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* 14:71-8

Sanders AR, Cao Q, Taylor J, Levin TE, Badner JA, Cravchik A, Comeron JM, Naruya S, Del Rosario A, Salvi DA, Walczyk KA, Mowry BJ, Levinson DF, Crowe RR, Silverman JM, Gejman PV (2001). Genetic diversity of the human serotonin receptor 1B (HTR1B) gene. *Genomics* 72 (1): 1–14. doi:10.1006/geno.2000.6411.

Sanders AR, Duan J, Gejman PV (2002). DNA variation and psychopharmacology of the human serotonin receptor 1B (HTR1B) gene. *Pharmacogenomics*. 3: 745-762.

Simon V, Czobor P, Balint S, Meszaros A e Bitter I (2009). Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis. *Br J Psychiatry* 194: 204-211.

Smoller JW, Biederman J, Arbeitman L, Doyle AE, Fagerness J, Perlis RH, Sklar P, Faraone SV. (2006) Association between the 5HT1B receptor gene (HTR1B) and the inattentive subtype of ADHD. *Biol Psychiatry*. 59(5):460–467.

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

Wallis D (2010). The search for biomarkers for attention deficit/hyperactivity disorder. *Drug News Perspect* 23: 438-449.

Wilens TE e Spencer TJ (2010). Understanding attention-deficit/hyperactivity disorder from childhood to adulthood. *Postgrad Med* 122: 97-109.

Young SE, Friedman NP, Miyake A, Willcutt EG, Corley RP, Haberstick BC e Hewitt JK (2009). Behavioral disinhibition: liability for externalizing spectrum disorders and its genetic and environmental relation to response inhibition across adolescence. *J Abnorm Psychol* 118: 117-130.

Zeni CP, Guimaraes AP, Polanczyk GV, Genro JP, Roman T, Hutz MH e Rohde LA (2007). No significant association between response to methylphenidate and genes of the dopaminergic and serotonergic systems in a sample of 120 Brazilian children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B: 391-394.

Tabela 1. Frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos do gene *HTR1B* em pacientes com TDAH e controles

Polimorfismo	Pacientes	Controles
rs11568817	N=493	N=618
Genótipos		
TT	146 (29,6%)	173 (28,0%)
TG	252 (51,1%)	307 (49,7%)
GG	95 (19,3%)	138 (22,3%)
Alelos		
T	44 (0,55)	653 (0,53)
G	442 (0,45)	583 (0,47)
rs130058	N=489	N=578
Genótipos		
AA	225 (46,0%)	247 (42,7%)
AT	209 (42,7%)	277 (47,9%)
TT	55 (11,2%)	54 (9,3%)
Alelos		
A	659 (0,67)	771 (0,67)
T	319 (0,33)	385 (0,33)
rs6296	N=497	N=611
Genótipos		
GG	254 (51,1%)	328 (53,7%)
GC	200 (40,2%)	241 (39,4%)
CC	43 (8,7%)	42 (6,9%)
Alelos		
G	708 (0,71)	897 (0,73)
C	286 (0,29)	325 (0,27)
rs13212041	N=514	N=612
Genótipos		
AA	343 (66,7%)	402 (65,7%)
AG	151 (29,4%)	190 (31%)
GG	20 (3,9%)	20 (3,3%)
Alelos		
A	837 (0,81)	994 (0,81)
G	191 (0,19)	230 (0,19)

rs11568817: Genótípicas $\chi^2=1,59$, $p=0,45$; Alélicas $\chi^2=1,21$, $p=0,27$

rs130058: Genótípicas $\chi^2=3,15$, $p=0,21$; Alélicas $\chi^2=0,11$, $p=0,74$

rs6296: Genótípicas $\chi^2=1,52$, $p=0,47$; Alélicas $\chi^2=1,30$, $p=0,25$

rs13212041: Genótípicas $\chi^2=0,61$, $p=0,74$; Alélicas $\chi^2=0,02$, $p=0,90$

Tabela 2. Frequências haplotípicas dos polimorfismos do gene *HTR1* em pacientes com TDAH e controles

Polimorfismo				TDAH N=503	Controles N=612
rs11568817	rs130058	rs6296	rs13212041		
G	T	G	A	0,3044	0,2846
T	A	C	A	0,2696	0,2340
T	A	G	G	0,1739	0,1667
G	A	G	A	0,1294	0,1724
T	A	G	A	0,0807	0,0831
T	T	G	A	0,0198	0,0066
G	A	G	G	0,0072	0,0051
G	A	C	A	0,0068	0,0063
T	T	C	A	0,0026	0,0219
G	T	C	A	0,0012	0,0039
G	A	C	G	0,0021	-
T	A	C	G	0,0013	-
G	T	C	G	0,0010	-
T	T	G	G	-	0,0154

Pacientes X controles: $\chi^2=10,33$ $p=0,04$
(nível de significância estabelecido em $p<0,006$)

Anexo 1. *Journal of Neural Transmission* – Instruções para os autores

Journal of Neural Transmission

Basic Neurosciences, Genetics and Immunology, Movement disorders, Dementias, Biological Psychiatry, Biological Child and Adolescent Psychiatry

ISSN: 0300-9564 (print version)

ISSN: 1435-1463 (electronic version)

The journal publishes Original Papers, Reviews, Short Communications, and Rapid Communications.

Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

References

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).

This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).

This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1993).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

Tables

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.