

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

Análise de polimorfismos nos genes dos receptores de serotonina 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} em pacientes deprimidos que tentaram o suicídio

Rafael Rebelo e Silva

Orientadora: Prof^a. Dra. Sandra Leistner-Segal

Porto Alegre, Julho de 2010

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

Análise de polimorfismos nos genes dos receptores de serotonina 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} em pacientes deprimidos que tentaram o suicídio

Rafael Rebelo e Silva

Orientadora: Prof^a. Dra. Sandra Leistner-Segal

Porto Alegre, Julho de 2010

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

S586a **Silva, Rafael Rebelo e**

Análise de polimorfismos nos genes dos receptores de serotonina 5-HT1A e 5-HT2A em pacientes deprimidos que tentaram o suicídio / Rafael Rebelo e Silva ; orient. Sandra Leistner-Segal. – 2010.
73 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

1. Depressão 2. Tentativa de suicídio 3. Polimorfismo genético 4. Receptor 5-HT1A de serotonina 5. Receptor 5-HT2A de serotonina
I. Leistner-Segal, Sandra II. Título.

NLM: WM 171

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Dedico este trabalho...
... aos que se foram...
...aos presentes...
...aos que virão.

Agradecimentos

A Sandra Leistner Segal por todas as oportunidades, principalmente, a de fazer a pós-graduação. Pela confiança, paciência na orientação, amizade e liberdade no trabalho. Por permitir que eu me desenvolvesse.

Ao Jair Segal pela atenção, paciência, amizade e grande colaboração no desenvolvimento desse trabalho, principalmente nas horas de “sufoco”.

Ao Giovanni Abrahão Salum pelo auxílio nas análises estatísticas.

A Luciana Hauber, pelo amor, carinho, compreensão e parceria.

Ao pessoal do Laboratório de Genética Molecular, Camila, Fabiana, Juliana, Paula, Laila, Ana Carolina, Isabel, Taiana, Thais, Luiza, pela doce convivência.

A todos os bolsistas de iniciação científica, em especial os mais próximos, Juliana e Roberto, pela ajuda no desenvolvimento dos trabalhos e pelos questionamentos que sempre ajudaram a me manter atualizado.

A minha família, Pai, Mãe, Carolina, Felipe, Priscila, Paulinho, Marcelo, Carlos Alberto Hauber, Saara Hauber, Maria Isabel, pelo apoio, suporte e segurança.

A Maria Lucia Scroferneker, pelo incentivo ao estudo, principalmente a pós-graduação.

Aos meus amigos, por serem presentes na minha vida.

E aos parceiros de SURF.

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas	7
Lista de figuras	9
Resumo	10
Abstract	11
Introdução	12
Epidemiologia do comportamento suicida	13
O comportamento suicida.....	15
A comorbidade e o comportamento suicida	16
Genética e o comportamento suicida	18
Sistema Serotoninérgico e Suicídio.....	21
Síntese de Serotonina.....	22
Receptores de Serotonina.....	26
Receptores 5-HT ₁	27
Receptores 5-HT _{1A}	28
Receptores 5-HT ₂	29
Receptor 5-HT _{2A}	30
Gene do receptor de serotonina 5-HT _{1A}	32
Gene do receptor de serotonina 5-HT _{2A}	34
Objetivos	37
Considerações Éticas.....	38
Referências	39
Artigo 1	53
Considerações Finais.....	66
APÊNDICE A	70
Anexo 1	72

Lista de Abreviaturas e Siglas

5-HIAA	Ácido 5-hidroxindolacético
5-HT	5-hidroxitriptamina ou Serotonina
5-HT _{1A}	Receptor de serotonina 1A
5-HT _{2A}	Receptor da serotonina 2A
5-HTP	5-hidroxitriptofano
5-HTT	Transportador da Serotonina
5-HTTLPR	Região polimórfica do gene do transportador de serotonina
Ach	Acetilcolina
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ARMS	Amplification Refractory Mutation System
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
COMT	Gene da Catecol <i>Orto-Metiltransferase</i>
DAG	Diacilglicerol
DEAF1	Deformed Epidermal Autoregulatory Factor 1 (Drosophila)
DM	Depressão Maior
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DSM-IV	Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais
GPCR	Receptores ligados à proteína G
GTP	Guanosina-trifosfato
HCPA	Hospital de Clinicas de Porto Alegre
HPS	Hospital de Pronto Socorro de Porto Alegre
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg ou Hardy-Weinberg Equilibrium
IADL	Instrumental Activities of Daily Living scale
IP ₃	Inositol trifosfato
LSD	Dietilamida do ácido lisérgico
MAO	Monoamino oxidase
MINI	Mini International Neuropsychiatric Interview
NUDR	Nuclear Deformed Epidermal Autoregulatory Factor
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Odds ratio
pb	Pares de base
PCR	Polimerase Chain Reaction

PET	Positron Emission Tomography Study
PIP ₂	fosfatil-inositol-bifosfato
PKC	Proteína quinase C
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SIS	Suicide Intent Scale
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSRIs	Inibidores seletivos de serotonina
TOC	Transtorno Obsessivo Compulsivo
TPH	Triptofano hidroxilase
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VNTR	Variable Number Tandem Repeats
WHO	Organização Mundial da Saúde, World Health Organization

Lista de figuras

Figura 1: Barreira hematoencefálica (transportador de triptofano)	Pagina 23
Figura 2: Síntese de serotonina	Pagina 24
Figura 3: Sistema serotoninérgico	Pagina 25
Figura 4: Receptor de serotonina	Pagina 27

Resumo

A presente pesquisa pretende mostrar que a participação de polimorfismos específicos podem favorecer ou fornecer uma vulnerabilidade maior a determinados indivíduos que, quando submetidos a condições específicas de estresse, podem tentar o suicídio. Nos últimos anos, vem crescendo na literatura científica o número de estudos que demonstram que o cérebro de vítimas de suicídio apresenta uma alteração nos receptores de serotonina. Este estudo teve como objetivo verificar a frequência dos polimorfismos dos receptores de serotonina 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A}, em pacientes deprimidos que tentaram o suicídio e em um grupo controle sem doença psiquiátrica. O trabalho foi desenvolvido utilizando-se um banco de DNA de pacientes deprimidos internados no Hospital de Pronto Socorro por tentativa de suicídio. Para o grupo controle, foram utilizados indivíduos sem diagnóstico psiquiátrico, selecionados entre funcionários do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A análise molecular do receptor 5-HT_{1A} foi realizada através da técnica de PCR-ARMS, e para o receptor 5-HT_{2A} foi utilizada a técnica de PCR-RFLP. Os pacientes com pelo menos uma cópia do alelo G do receptor de serotonina 5-HT_{1A}, apresentaram maior suscetibilidade à tentativa de suicídio do que os pacientes que não apresentaram o alelo G (P=0.029). Além disso, esse efeito foi associado com a amostra masculina (P=0.007). Os resultados dos testes para o receptor 5-HT_{2A} indicaram uma associação do genótipo CC com o grupo controle (P= 0,046). Os testes para verificar a influencia desse polimorfismo em relação ao gênero também não foram significativos (P=0,224 e P=0,183). Baseado nos resultados pode-se corroborar a hipótese de que, para os receptores 5-HT_{1A}, a presença do alelo G pode influenciar a atividade serotoninérgica nos homens. Assim, o alelo G torna-se um possível fator de suscetibilidade para o sexo masculino, somando as condições biológicas, ambientais e comportamentais, podendo resultar em uma maior vulnerabilidade ao comportamento suicida. Para os receptores 5-HT_{2A}, os resultados não foram significativos, indicando que a presença do alelo polimórfico C não oferece suscetibilidade para essa amostra de pacientes depressivos com tentativa de suicídio.

Abstract

This research aims to show that the involvement of specific polymorphisms may promote or provide an increased vulnerability to certain individuals who, when subjected to specific conditions of stress, may have suicide attempts. In recent years, the number of scientific papers showing that the brain of suicide victims present a change in serotonin receptors is growing. This research aimed to check the polymorphisms frequency of serotonin receptors 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} in depressive patients with suicide attempts and in a control group without psychiatric disease. The study was conducted using a DNA bank of depressive patients hospitalized in Hospital de Pronto Socorro for attempted suicide. The control group, consisted of individuals without psychiatric diagnosis, selected from employees of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The molecular analysis of 5-HT_{1A} receptor was performed using the PCR-ARMS technique, and the 5-HT_{2A} receptor was performed using the PCR-RFLP technique. Patients with at least one copy of G allele of serotonin receptor 5-HT_{1A}, showed increased susceptibility to suicide attempts compared to patients who did not have the G allele (P=0.029). Moreover, this effect was associated with men (P=0.007). The results for the 5-HT_{2A} receptor indicates an association of CC genotype with the control group (P= 0,046). The tests to check the influence of this polymorphism in relation to gender were not significant (P=0,224 and P=0,183). Based on these results we can corroborate the hypothesis that, for the 5-HT_{1A} receptors the G allele may influence serotonergic activity in men, by decreasing the transcription of 5-HT_{1A} receptors. Therefore, the G allele becomes a possible susceptibility factor for males that, with the addition of biological, environmental and behavioral conditions, may result in an increased vulnerability to suicidal behavior. For the 5-HT_{2A} receptors, the results were not significant, indicating that the presence of the polymorphic C allele does not provide susceptibility for this sample of depressive patients with suicide attempt.

Introdução

Algumas hipóteses têm sido questionadas por pesquisadores em todo o mundo, buscando provar que fatores genéticos podem contribuir para o comportamento suicida. O que a presente pesquisa pretende mostrar é que a participação de determinado polimorfismo pode favorecer ou fornecer uma vulnerabilidade maior a determinados indivíduos que, quando submetidos a condições específicas de estresse, pode cometer atos autodestrutivos como tentativas de suicídio. Isso não sugere ou significa que um único gene possa ser o responsável por condutas suicidas. Não se afirma ou se acredita em determinismo genético. Sabe-se que o comportamento suicida está relacionado com uma combinação de fatores emocionais, sócio-culturais, filosóficos, religiosos e também biológicos. Essa hipótese é baseada na observação e no atendimento cotidiano de pacientes que tentam o suicídio no Hospital de Pronto Socorro da cidade de Porto Alegre e também na revisão de diversos estudos publicados em revistas de genética e psiquiatria de âmbito internacional.

Sabe-se que muitos sujeitos que tentaram o suicídio têm histórico familiar de suicídio e de tentativas por parentes. A compreensão de uma situação complexa como essa pode gerar alívio e estimular a busca de um tratamento adequado. A negação ou a incompreensão sobre o que está se passando com o sujeito é que pode ser trágica, como a literatura tem nos demonstrado.

Pensa-se que o tema suicídio é controverso, complexo e, por isso, delicado. Muitas pessoas, inclusive aquelas com quadros depressivos, nunca tentarão o suicídio. Mesmo assim, não podemos deixar de nos preocupar com aquelas pessoas que já fizeram alguma tentativa e buscam entender o que se passa com elas. A informação, o conhecimento e a melhor compreensão a respeito de uma doença ou uma condição podem realmente beneficiar as pessoas que passaram por determinada situação e, assim, evitar futuras tragédias pessoais e familiares. Este projeto faz parte de um projeto maior que engloba a análise de vários genes que podem estar envolvidos na suscetibilidade à impulsividade e à depressão, reforçando esta linha de pesquisa emergente.

Epidemiologia do comportamento suicida

A cada ano, um milhão de pessoas comete o suicídio ao redor do mundo. Estima-se no total que ocorram aproximadamente 30.000 suicídios por ano nos EUA e 120.000 na Europa (Jamison, 2002). O coeficiente de mortalidade por suicídio para a população geral mundial está entre 10 e 20 para cada 100.000 indivíduos. Embora os dados epidemiológicos variem entre os diferentes países, o coeficiente brasileiro está abaixo da média mundial. Entretanto, no Rio Grande do Sul, o coeficiente de mortalidade por ano é duas vezes maior (9,88 suicídios para cada 100.000 habitantes por ano) que a média nacional (MS/SVS, 2006). No ano de 2007, a mortalidade no Rio Grande do Sul por suicídio foi de 1099 pessoas, sendo 878 do sexo masculino e 221 do sexo feminino, sendo que a maioria (911 pessoas) utilizou métodos violentos (enforcamento e armas de fogo) (SIM/RS, 2008).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o suicídio foi responsável por quase 2% das mortes do mundo no ano de 1998, o que coloca essa condição na frente de mortes causadas por guerras e bem à frente das mortes por homicídios. De uma forma sucinta, a OMS define o ato suicida como auto-agressão, com graus variados de intenção letal, e suicídio como um ato com desfecho fatal (WHO, 1999). As tentativas de suicídio constituem o mais poderoso fator preditivo de um eventual suicídio completo (Harris *et al.*, 1997), além de provocar uma significativa morbidade resultando em gastos significativos dos recursos de saúde. Segundo Mann (1999), para cada suicídio ocorre cerca de 10 tentativas de suicídio. Embora as mulheres façam mais tentativas de suicídio que os homens, estes tem uma mortalidade quatro vezes maior que as mulheres em suas tentativas. Sabe-se que 80% dos suicídios completos são de pessoas do sexo masculino (Roy, 1999). Estudos demonstram que ser casado é um fator de proteção para os homens, enquanto ter um filho menor de dois anos de idade é um fator de proteção para o suicídio nas mulheres (Oquendo *et al.*, 2007). O comportamento suicida apresenta-se em todas as idades e constitui a terceira causa de morte entre adolescentes e adultos jovens menores de 24 anos, e a quarta causa mais freqüente de morte nas crianças na faixa dos 10 aos 15 anos nos Estados Unidos (Roy, 2000). No Brasil, a mortalidade proporcional

por suicídio de maior magnitude é observada nas adolescentes de 15 a 19 anos (Werlang e Botega, 2004).

Em 1999, a cidade de Campinas participou de um estudo multicêntrico de intervenção no comportamento suicida (SUPRE), lançado pela OMS com a participação de 8 países. Em 2005, foi criado um grupo de trabalho visando estabelecer as diretrizes nacionais de prevenção ao suicídio (Portaria Ministerial nº 2.542 de 2005). E no ano de 2006, a Portaria Ministerial 1.876 criou as diretrizes a serem implantadas em todas as unidades federadas. Assim, surgiu um manual dirigido aos profissionais das equipes de saúde mental lançado no I Seminário Nacional do Suicídio, ocorrido em 2006 em Porto Alegre (RS), como parte da política a ser desenvolvida em todo o país.

Mesmo havendo definições sobre os fatores de risco e proteção do suicídio, estes ainda se constituem insuficientes na prevenção e no tratamento do problema. Muitos suicídios ocorrem de forma inesperada e outros, mesmo esperados por seu risco, parecem ser imprevisíveis. Apenas uma minoria é desencadeada por eventos estressantes em pessoas com uma vida emocional saudável e, nesses casos, o risco de um comportamento suicida é geralmente temporário e potencialmente passível de prevenção.

Paralelamente aos avanços científicos, as sociedades contemporâneas ainda tratam o suicídio como algo vergonhoso, resultante de uma falência da responsabilidade pessoal, da coesão familiar ou do sistema social. Esta visão promove uma série de dificuldades na intervenção e na pesquisa desses casos e impossibilita uma adequada notificação para fins estatísticos devido à subnotificação ou informação de dados falsos. Botega (2000) alerta para a necessidade de se levar em consideração a grande disparidade entre as regiões brasileiras, que determinam níveis variados de dificuldade de registro, comprometendo a fidelidade dos dados e, assim, podendo elevar os casos de subnotificação, tornando os dados ainda mais alarmantes. Os suicídios comumente deixam de ser relatados, em parte porque os suicidas disfarçam suas ações e em parte porque nas sociedades em que são vistos sob um juízo moralista, a comunicação tende a ser evitada (Solomon, 2002).

O comportamento suicida

Da mesma forma que traços considerados de comportamento normal são transmitidos de pais para filhos, certos transtornos mentais são comuns entre pessoas de uma mesma família. Podemos considerar as doenças mentais ou psiquiátricas como doenças complexas ou multifatoriais. São doenças que não exibem um padrão de herança mendeliana de transmissão, mas exibem um padrão de herança familiar, pois sofrem alguma influência genética e tem origem ou causa dita complexa. Há fatores genéticos e ambientais envolvidos na gênese destas doenças e tais fatores podem ser tanto de risco como de proteção.

De acordo com o histórico familiar, pode haver uma maior suscetibilidade ou predisposição genética do indivíduo para desenvolver um transtorno psíquico, porém fatores protetores ambientais podem interferir na sua manifestação, diminuindo o risco de ocorrência. A combinação de fatores genéticos e ambientais de risco e fatores protetores contribui para a propensão individual de desenvolvimento de transtornos. Outros fatores, como a idade de manifestação, gravidade da doença e expressão dos sintomas clínicos, devem também ser considerados.

Nos últimos anos, foram constatadas evidências crescentes de que o comportamento suicida tem forte determinante neurobiológico, não sendo apenas uma resposta lógica a um estresse extremo. Estes determinantes neurobiológicos podem ser independentes do transtorno psiquiátrico com o qual estão associados. As pessoas que estão sob risco de suicídio tendem a fazer tentativas de modo relativamente precoce, na evolução de seus quadros. (Malone *et al.*, 1995). Para compreender melhor o comportamento suicida, Mann (1998) sugere a construção de um modelo que pode ser visto como um modelo diátese-estresse, explicando esta suscetibilidade. A diátese (vulnerabilidade) determina como um indivíduo reage a um evento estressor, e depende de fatores que moldam a sua personalidade como os fatores genéticos e ambientais, experiências infantis, entre outros.

Ao considerar a depressão como um único fator, percebe-se que muitos pacientes deprimidos nunca se tornam suicidas, e muitos suicídios são cometidos por pessoas que não possuem depressão. Oquendo *et al.*, (2000) afirmam que

pacientes que tentaram o suicídio tem tanto diátese (baixo limiar) para o comportamento suicida quanto um fator desencadeador precipitando o comportamento (estressor). Os autores observaram que alguns pacientes com depressão maior são vulneráveis para agir quando sofrem impulsos suicidas. Esta vulnerabilidade resulta da interação entre pontos desencadeadores ou precipitantes, e o limiar de comportamento suicida.

Entre os estressores associados aos atos suicidas está o desencadeamento ou regressão de uma doença psiquiátrica aguda como a depressão, abuso de substâncias como álcool e drogas, doença orgânica, crise familiar ou eventos de vida adversos que podem servir como um “gatilho”. Porém, o elemento mais importante, sugestivo de risco para a tentativa de suicídio é a história pregressa de outras tentativas de suicídio.

A comorbidade e o comportamento suicida

A maioria das pessoas que tentam o suicídio apresenta algum diagnóstico de doença psiquiátrica, mais comumente transtornos de humor (Mann, 2003). Porém, a tentativa de suicídio pode também estar relacionada a outras condições psiquiátricas, incluindo esquizofrenia, abuso de substâncias (álcool e drogas) e transtornos de personalidade.

O abuso e dependência de drogas por pessoas com transtornos psiquiátricos estão associados a um maior risco de suicídio. O abuso de drogas tende a iniciar na adolescência e pode desempenhar papel proeminente no aumento dos casos de suicídios nesta faixa etária. Nos jovens, o abuso de drogas pode estar associado a uma elevada frequência à depressão e transtorno bipolar (Tondo *et al.*, 2001). Outras características podem aumentar o risco para o comportamento suicida, tais como: traços de agressividade/ impulsividade, desesperança ou pessimismo, deterioração social e profissional, doenças orgânicas e alterações nutricionais (Mann, 2003; Segal, 2009).

Diversas pesquisas mostraram que o suicídio geralmente aparece associado a doenças mentais, estando o diagnóstico de depressão maior presente em 40% dos casos (Turecki, 2001) elevando-se para além de 60% no transtorno bipolar e na distímia. O risco de mortalidade por suicídio durante a vida nos pacientes com transtornos afetivos é em torno de 7% nos homens e 1% nas mulheres (Blair-West *et al.*, 1999).

A ideação suicida e o comportamento de risco estão presentes em famílias com história de depressão grave (Allen *et al.*, 2005), sintomas psicóticos em comorbidade com abuso ou dependência de álcool (Bottlender *et al.*, 2000). Além disso, presença de sintomas do transtorno de pânico (Frank *et al.*, 2002) e início precoce de transtorno afetivo (Carter *et al.*, 2003).

Traços de personalidade como fatores de vulnerabilidade ao comportamento suicida têm sido descritos em muitos estudos. A impulsividade, agressividade e hostilidade são fatores de risco para o comportamento suicida nos diferentes transtornos psiquiátricos (Mann *et al.*, 1999a). Baca-Garcia *et al.*, (2006), comparando pacientes deprimidos americanos e espanhóis, encontraram no grupo de pacientes americanos tentativas de suicídio de alta letalidade com uma história de comportamento agressivo maior do que o grupo de pacientes espanhóis, sugerindo que a maior letalidade das tentativas de suicídio estava associada ao maior nível de agressão.

Em relação ao gênero, entre homens e mulheres, os riscos de suicídio são semelhantes, estando associados com transtornos bipolares, assim como unipolares com o abuso de drogas. Porém, o comportamento suicida difere entre homens e mulheres, sendo o número de tentativas de baixa letalidade maior nas mulheres, enquanto que o número de suicídios concretizados é maior nos homens devido à maior violência e/ou agressividade.

O número de diagnósticos comórbidos aumenta substancialmente o risco para comportamento suicida (Mann, 1998). As doenças orgânicas, em consonância com o modelo proposto por Mann (1998), aumentam o risco de atos suicidas e do suicídio, principalmente aquelas doenças que afetam o sistema nervoso central

como a AIDS, epilepsia, doença de Huntington, traumatismo crânio-encefálico, insuficiência renal crônica e acidentes vasculares cerebrais, conferindo um maior risco que outras doenças (Mann *et al.*, 1999; Sher *et al.*, 2001).

Genética e o comportamento suicida

Vários estudos têm evidenciado os possíveis efeitos de determinados genes na modulação dos transtornos psiquiátricos, principalmente o comportamento suicida. Além disso, muitos autores têm apontado que existe grande probabilidade de o sistema serotoninérgico encontrar-se sob controle genético, com o envolvimento de fatores não bem esclarecidos, em pessoas com comportamento suicida de risco. Deste modo, as variantes genéticas tornam-se um fator de suscetibilidade para desencadear esse tipo de comportamento. Entretanto, também devemos dar importância aos fatores psíquicos, sociais e biológicos como fatores determinantes do comportamento suicida.

Estudos em famílias com indivíduos adotados ou gêmeos, e famílias com ausência desses fatores, podem fornecer evidências da herança do comportamento suicida (Voracek, *et al.*, 2007). Análises de famílias sem a presença de adoção ou gêmeos e de famílias com gêmeos monozigóticos e dizigóticos, indicam a presença de um forte componente genético relacionado tanto às tentativas de suicídio quanto ao suicídio propriamente dito. O risco de suicídio em familiares de suicidas é seis vezes maior do que o risco na população em geral (Brent *et al.*, 1996). Além disso, pacientes com história familiar de suicídio têm, em mais de 50% dos casos, o diagnóstico primário de transtorno afetivo (Roy, 1983).

Pesquisas com gêmeos têm mostrado evidências de um fator genético para o comportamento suicida, maior entre gêmeos monozigóticos do que nos dizigóticos (Roy *et al.*, 2001). Em estudos com adoção, foi encontrado um maior risco de suicídio para os familiares biológicos de pessoas adotadas que cometeram suicídio quando comparadas aos familiares biológicos de indivíduos adotados do grupo controle (Wender *et al.*, 1986; Roy *et al.*, 1999). Outra evidência aponta que filhos de

pacientes que tentaram suicídio apresentam um risco maior para a tentativa do que filhos de pessoas que não tentaram suicídio (Brent *et al.*, 2002. Melhem *et al.*, 2007).

A predisposição ao comportamento suicida pode desencadear na família independente da doença psiquiátrica primária (Brent *et al.*, 1996), ou seja, famílias podem ter indivíduos apresentando comportamento suicida, mesmo que cada um tenha o diagnóstico de uma doença no eixo I ou II diferentes. Estes dados contribuem para o entendimento de que o comportamento suicida tem um componente genético na sua predisposição, independente da doença psiquiátrica presente inicialmente (Pujol, 2006). Além disso, o aparecimento do fenótipo está fortemente relacionado com os fatores ambientais e o histórico de vida dos indivíduos.

Através da genética molecular, pode-se realizar uma busca no genoma humano, procurando variações inerentes às populações em genes relacionados às rotas de metabolismos de neurotransmissores que possam explicar alguns tipos específicos de comportamentos, como por exemplo, o comportamento suicida. Um exemplo é a escolha de genes relacionados ao sistema serotoninérgico que tenham polimorfismos como marcadores para o estudo. Polimorfismos são alterações no genoma, que normalmente não causam dano à proteína que o gene codifica, ou não alteram o processamento ou a estabilidade do RNA mensageiro, apresentando uma frequência de pelo menos 1% na população.

O gene do transportador de serotonina (5-HTTLPR) (Lesch *et al.*, 1994) tem sido investigado em muitos estudos de associação genética, mas com resultados controversos. O 5-HTT é uma proteína responsável pela recaptação da serotonina (5-HT) extracelular para dentro do neurônio pré-sináptico. É um dos principais alvos para antidepressivos e tem uma função chave na fisiopatologia de muitos transtornos psiquiátricos. Em um estudo realizado com uma amostra de pacientes com tentativa de suicídio, na região sul do Brasil, observou-se um maior risco para o comportamento suicida em pacientes depressivos portadores dos genótipos SS e SL (Segal, 2006). Outros estudos ainda continuam a encontrar resultados controversos (De Luca *et al.*, 2005; Xian-Zhang *et al.*, 2006; Bah *et al.*, 2008; Garcia *et al.*, 2010; Wells *et al.*, 2010). A enzima triptofano hidroxilase (TPH) é uma enzima que limita as

taxas de serotonina no cérebro (Cooper *et al.*, 1961), e por isso seu gene é considerado importante em muitos estudos com transtornos psiquiátricos (Hariri e Weinberger, 2003; De Luca *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006; Porter *et al.*, 2008; Perroud *et al.*, 2009).

Outro alvo de estudos relacionados aos transtornos comportamentais é a Monoaminoxidase (MAO), que é uma enzima oxidativa que inativa a 5-HT, convertendo-a em Ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA). Acredita-se que uma alteração polimórfica no gene desta enzima possa influenciar os níveis de serotonina, noradrenalina e dopamina no cérebro, resultando em alterações comportamentais como transtornos de humor e comportamento agressivo. A agressividade e impulsividade podem ser um fator de predisposição ao suicídio, o qual foi associado com uma diminuição da atividade serotoninérgica (Mann, 2001). A MAO pode ser encontrada em alguns estudos de associação interagindo com a COMT e relacionando os efeitos ao transtorno depressivo maior (Leuchter, *et al.*, 2009).

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é uma neurotrofina importante para o desenvolvimento, sobrevivência e plasticidade neuronal. Existem evidências que o BDNF possa exercer certa influência na neurotransmissão serotoninérgica, aumentando o risco para o desenvolvimento de transtornos de humor (Henningsson *et al.*, 2009; Dwivedi, 2009; Schenkel *et al.*, 2010).

Os receptores de serotonina (5-HTR) vêm sendo amplamente estudados, pois são muito importantes na ação do neurotransmissor serotonina. Estes receptores vêm sendo relacionados a diversos transtornos psiquiátricos tais como depressão com comportamento suicida (Pata, *et al.*, 2004; Drago, 2008; François; 2008;). Sendo assim, o conhecimento das vias serotoninérgicas, desde sua síntese à sua degradação e ativação de seus receptores, permite uma melhor compreensão dos transtornos depressivos e das tentativas de suicídio.

Sistema Serotoninérgico e Suicídio

Alguns modelos têm sido propostos para explicar as possíveis bases biológicas relacionadas à modulação do humor. Dentre esses modelos, inúmeros sistemas de neurotransmissão e segundos mensageiros parecem exercer efeitos modulatórios no humor. Estudos aplicados aos transtornos afetivos como a depressão, geram hipóteses envolvendo o neurotransmissor serotonina, assim como o sistema serotoninérgico. Diversos estudos têm evidenciado que as proteínas e receptores envolvidos na via serotoninérgica desempenham um papel importante no comportamento suicida (Mann, 1998; Stahl, 2002).

Um fator neurobiológico importante, ao se considerar o limiar de um indivíduo para agir sob impulsos suicidas, é a função serotoninérgica cerebral. Desde a década de 70, inúmeros estudos bioquímicos têm mostrado uma associação entre a baixa atividade serotoninérgica e a agressividade, impulsividade e comportamento suicida (Asberg *et al.*, 1976). Há evidências de que o sistema serotoninérgico está em parte sob controle genético (Mann, 1998), assim, o risco de um comportamento suicida, atos agressivos, alcoolismo e abuso de substâncias (drogas) teriam uma predisposição genética mediada por este sistema neurotransmissor (Mann, 1998; Mann *et al.*, 1999a, 1999b, 2001). Alguns estudos apontam que os níveis de 5-HIAA, o principal metabólito da serotonina, encontra-se reduzido em indivíduos que cometeram suicídio, indicando a relação entre o comportamento suicida e a baixa atividade do sistema serotoninérgico (Asberg *et al.*, 1976).

É importante destacar que quanto mais baixo os níveis de serotonina cerebral, mais grave é a tentativa de suicídio, havendo, portanto, correlação direta com a letalidade (Mann *et al.*, 1999; Sher *et al.*, 2001). Outro fato significativo é que existe relação entre os baixos níveis cerebrais de serotonina e a agressividade, não se esquecendo que o suicídio pode ser entendido como uma auto-agressividade. Como ponto interessante, o sexo feminino tem um nível médio mais elevado de serotonina cerebral que o sexo masculino, e menor incidência de suicídio (Mann *et al.*, 1999).

Sabe-se também, que há uma interconexão entre as diversas vias neurotransmissoras. Estes sistemas estão, em parte, sob influência genética, uma vez que há uma relação entre variantes genéticas relacionadas à impulsividade, alterações psicomotoras, agressividade e anormalidades biológicas que envolvem genes e seus produtos. Fatores genéticos relacionados à síntese de neurotransmissores e receptores, os quais são transmitidos independentemente, explicam em parte os riscos para depressão maior e para o suicídio. Por isso, a medicina tem se desenvolvido cada vez mais de maneira a incorporar tecnologias de ponta, como o uso da biologia molecular, para permitir o diagnóstico mais precoce e preciso de inúmeras doenças, assim como para auxiliar no entendimento de sua patogênese, permitindo o desenvolvimento de novos tratamentos ou uma prevenção mais eficaz.

Síntese de Serotonina

A serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) é um neurotransmissor conhecido por ser uma amina biogênica por apresentar um anel indol (Lehninger, 2006; Kapczinski *et al.*, 2004) que atua via membrana do receptor. Está envolvido em diversas áreas do sistema nervoso central e tecidos periféricos, bem como em tecidos não neuronais (sanguíneo, gastrointestinal, endócrino, sensorio, sistema cardiovascular e etc.). No cérebro, os neurônios serotoninérgicos originaram-se primariamente nos núcleos da rafe, no tronco cerebral, e se projetam para as demais áreas do sistema nervoso central (SNC), em que regulam uma ampla variedade de funções sensoriais, motoras e corticais (Kapczinski *et al.*, 2004). Na periferia, a serotonina está envolvida em diversas funções como a regulação dos reflexos entéricos, a modulação da forma na mudança e agregação de plaquetas, a modulação vascular da contração dos músculos lisos, a iniciação da atividade primária nos nociceptores aferentes e a regulação da citotoxicidade e fagocitose dos linfócitos (Julius, 1991).

A 5-HT é um neurotransmissor constituído pelo aminoácido triptofano, que se destaca dos demais aminoácidos por pertencer ao grupo dos aminoácidos

essenciais e ser menos abundante na dieta. Deste modo, a oferta de triptofano no organismo é proporcional a quantidade de alimentos ingeridos ricos em triptofano. Essas características são importantes quando consideramos o amplo papel que seu produto final desempenha no equilíbrio fisiológico normal e a facilidade com que a produção deste pode ser afetada quando interrompida a escassa oferta desse aminoácido.

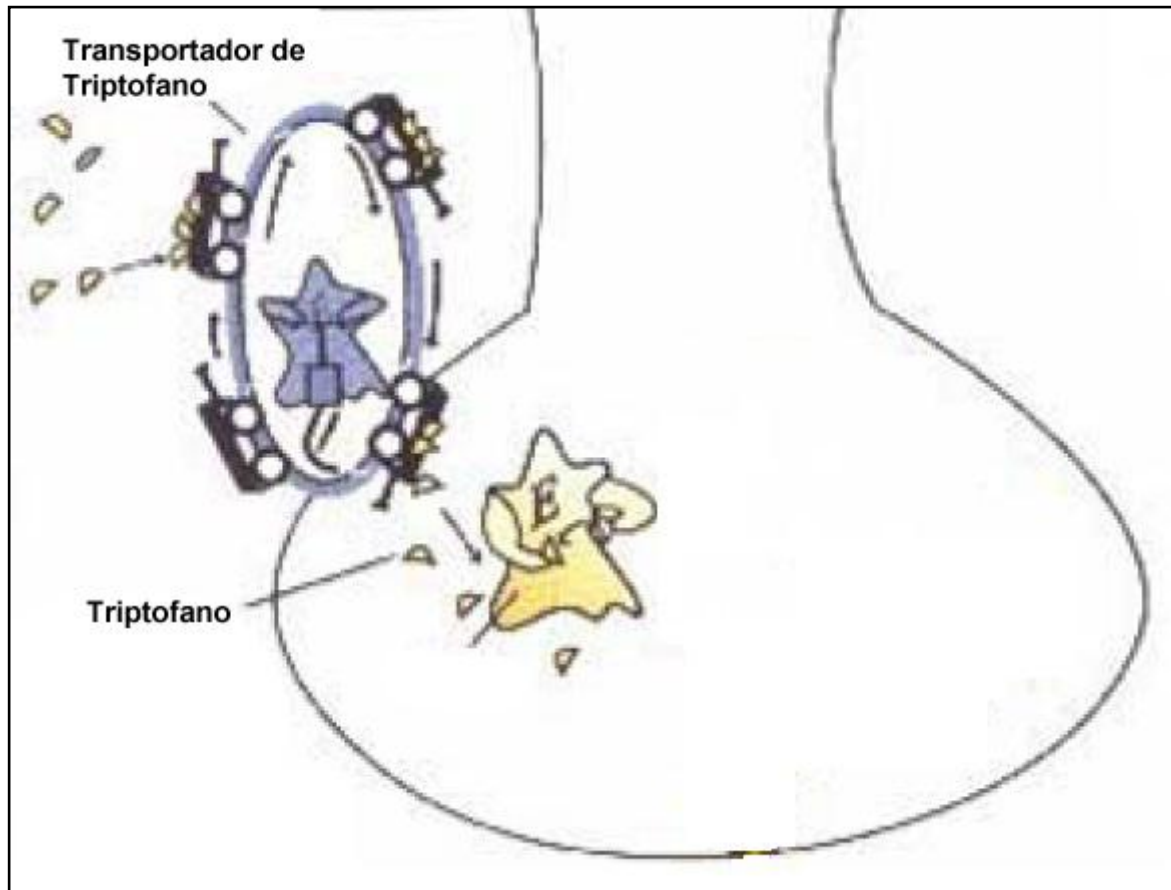


Figura 1: Barreira hematoencefálica (transportador de triptofano) (Adaptado de Stahl, 2002).

A síntese de 5-HT dá-se quando o triptofano absorvido é levado para o sistema nervoso central, passando pela barreira hematoencefálica e convertido em 5-HT (Figura 1). A baixa permeabilidade desta barreira ao triptofano exige que o mesmo utilize a proteína transportadora de aminoácidos num processo de transporte ativo. Além disso, o triptofano não é o único aminoácido a passar pela barreira hematoencefálica, tendo que disputar a passagem com outros tipos de aminoácidos (Oldendorf e Szabo, 1976; Voet, 1995; Lehninger, 2006). Passada essa barreira, o triptofano sofre uma hidroxilação pela enzima triptofano hidroxilase, transformando-o

em 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Logo após, ocorre uma descarboxilação da 5-HTP, transformando-a em 5-HT (Figura 2).

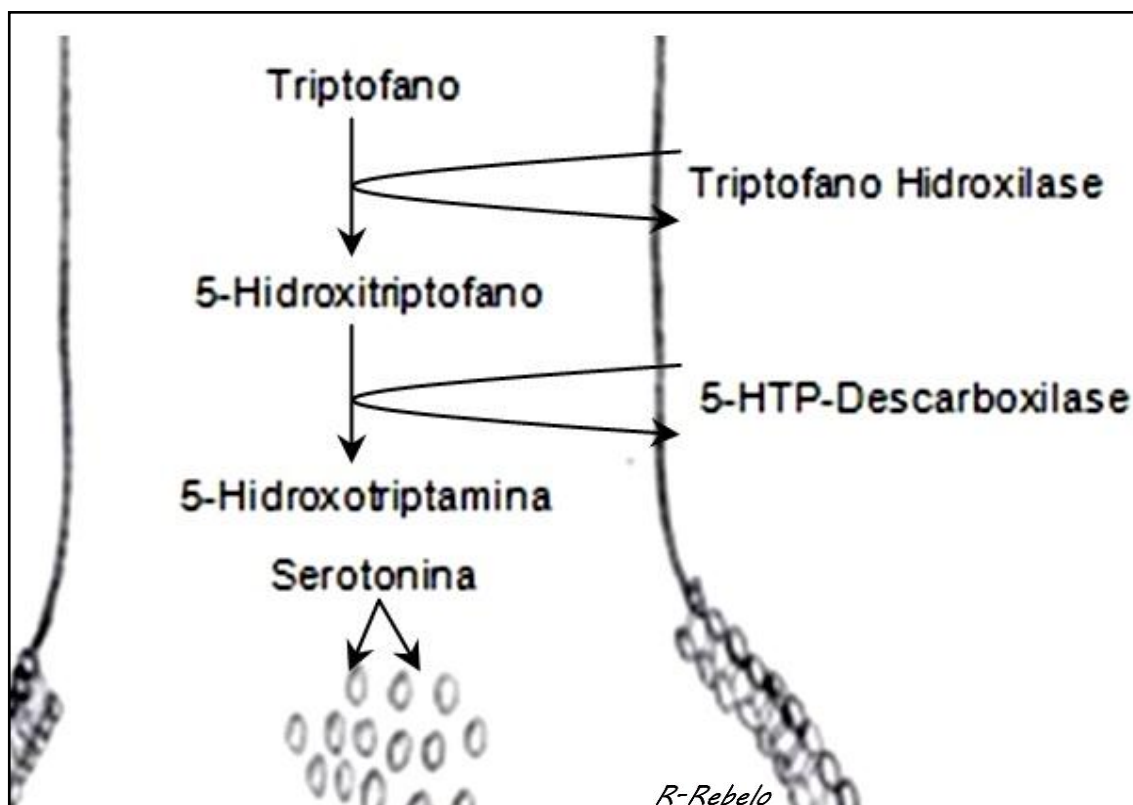


Figura 2: Síntese de Serotonina.

A serotonina formada é agrupada em vesículas (vesículas pré-sinápticas) nos terminais axônicos que, ao serem liberadas por exocitose através dos neurônios serotoninérgicos, rompem-se, liberando-a na fenda sináptica. Na fenda sináptica, a 5-HT atinge os receptores de serotonina 5-HTR, completando a sinapse. Parte da serotonina que não chega até os receptores é recaptada para o neurônio pré-sináptico através do transportador de serotonina 5-HTT. Deste modo, a 5-HT pode ser reagrupada novamente em vesículas para ser liberada ou degradada pela enzima Monoaminoxidase (MAO), dentro ou fora do neurônio pré-sináptico. A MAO apresenta-se em duas isoformas (MAO-A e MAO-B), ambas encontradas no tecido neuronal, e apresentam proporções distintas e em diferentes regiões do cérebro. A MAO é uma enzima portadora de flavina, localizada primariamente na membrana externa das mitocôndrias e encontrada nos terminais nervosos, no fígado e em outros órgãos. Esta enzima oxidativa inativa a 5-HT, convertendo-a em 5-HIAA

(Romeiro *et al.*, 2003). O 5-HIAA é um metabólito facilmente medido e considerado como um marcador da função serotoninérgica. Seus níveis estão elevados quando há um aumento na produção de 5-HT (Figura 3) (Kapczinski, *et al.*, 2004).

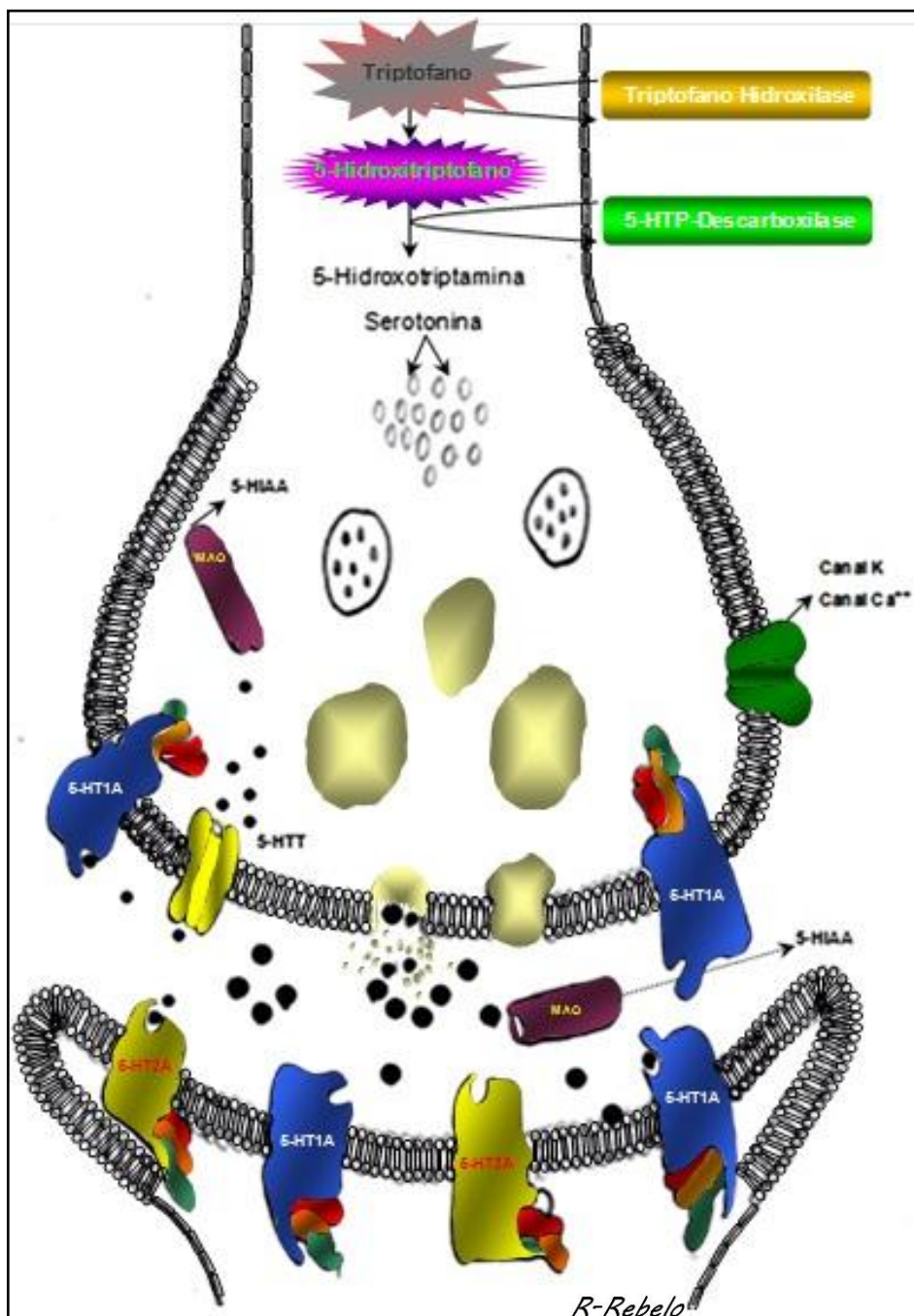


Figura 3: Sistema serotoninérgico. Receptor de serotonina 1A (5-HT_{1A}), receptor de serotonina 2A (5-HT_{2A}), transportador de serotonina (5-HTT), monoaminoxidase (MAO), Ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA).

Receptores de Serotonina

Os receptores de serotonina (5-HT_R) são responsáveis pela mediação do sinal do neurotransmissor serotonina. Esses receptores localizam-se em neurônios pré e pós-sinápticos nas membranas das células nervosas, no córtex cerebral, núcleos da rafe, mesencéfalo, músculos lisos e nos intestinos. Em um cérebro intacto, a função dos diversos receptores 5-HT pode ser associada com respostas fisiológicas específicas que vão desde a modulação da atividade neuronal à liberação de neurotransmissores na mudança de comportamento.

Por ser um dos mais antigos neurotransmissores na evolução, estima-se que os receptores 5-HT surgiram cerca de 700 a 800 milhões de anos, em uma única célula eucarionte (Hannon e Hoyer, 2008). As principais classes dos receptores 5-HT devem ter divergido em torno de 750 milhões de anos atrás, muito antes dos receptores colinérgicos, adrenérgicos e dopaminérgicos, embora a família dos receptores ligados à proteína G (GPCR) possam existir há mais de 1 bilhão de anos. Isso pode explicar porque a 5-HT interage com uma grande diversidade de receptores da família dos GPCR e também com as famílias dos receptores ionotrópicos (ligados a canais iônicos), acetilcolina, GABA ou glutamato e outros subtipos de receptores com uma ampla diversidade de funções (Hannon e Hoyer, 2008).

Essa família de receptores é conhecida por ser ligada à proteína G, localizada na superfície interna da membrana plasmática e que consiste de uma subunidade α que hidrolisa a guanosina-trifosfato (GTP) e subunidade β e γ (Hauache, 2001; Kapczinsk *et al.*, 2004). Os receptores 5-HT são divididos em sete famílias (5-HT₁₋₇), sendo cada família dividida em seus respectivos subtipos. Estudos a nível molecular têm estabelecido, em grande parte com o uso de modelos de receptores recombinantes e perfis hidropáticos, que a família dos receptores 5-HT apresenta mais de sete hélices transmembranas, ligadas a uma proteína G de receptores metabotrópicos (Figura 4).

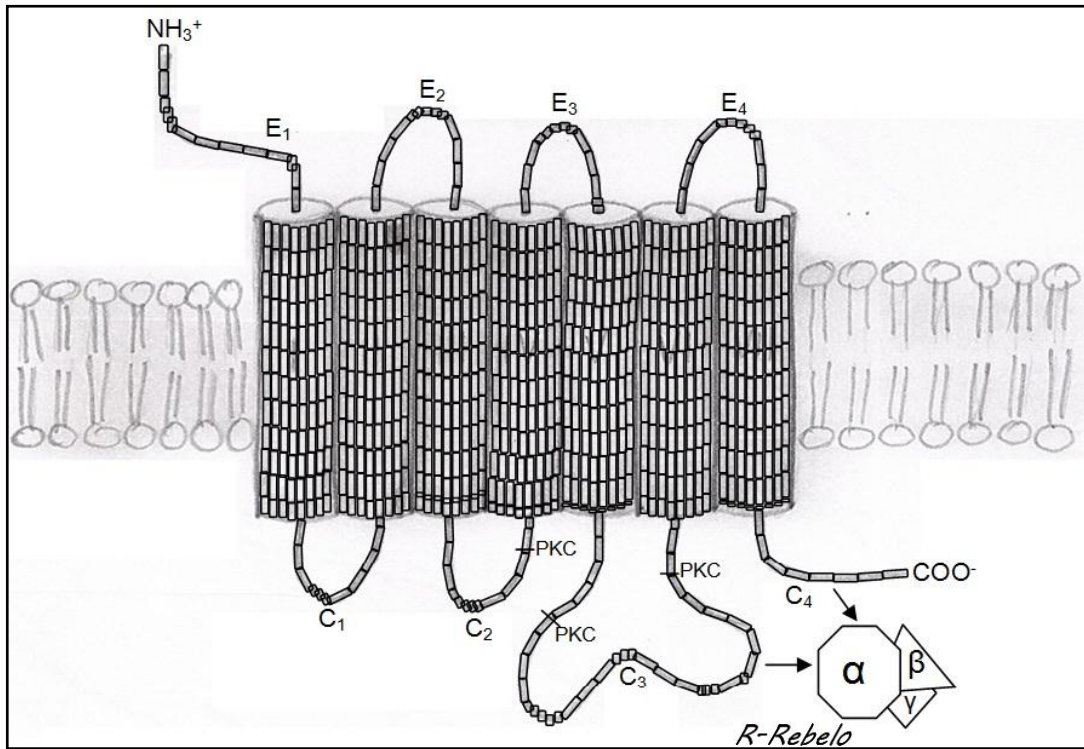


Figura 4: Receptor de Serotonina. Terminação amina (NH_3^+), terminação carboxil (COO^-), voltas intra celulares ($\text{C}_1, \text{C}_2, \text{C}_3$ e C_4), voltas extra celulares ($\text{E}_1, \text{E}_2, \text{E}_3$ e E_4), sítios de ligação da proteína quinase C (PKC) e subunidade α , β e γ da proteína G (Adaptado de Lanfumey *et al.*, 2000).

A ativação dos receptores 5-HT afeta várias enzimas, como a adenilil ciclase, fosfolipase C (PLC) e canais de cátions, especialmente K^+ e Ca^{++} , através da ativação de proteínas G específicas intracelular. Existe certo grau de homologia na sequência de todas as ligações da proteína G dos receptores 5-HT no nível de seu domínio transmembrana. Em contraste, a sequência de aminoácidos na porção N terminal e na terceira volta intracelular apresenta-se exclusiva para cada tipo de receptor (Lanfumey *et al.*, 2000).

Receptores 5-HT₁

A família dos receptores 5-HT₁ possui uma grande sequência de aminoácidos homólogos e pode ser subdividida dependendo de sua ligação a segundos mensageiros via proteínas G. Os receptores 5-HT₁ são, em sua maioria, ligados a proteínas G_{i/o}, que são sensíveis à toxina pertussis e ligados negativamente à adenilil ciclase (Kapczinski, *et al.*, 2004; Hannon e Hoyer, 2008). Nas células, esse processo pode levar a despolarização da membrana e inibição do disparo neuronal

(Hannon e Hoyer, 2008). A família dos receptores 5-HT₁ é composta por 5 subtipos de receptores (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} e 5-HT_{1F}) que, nos seres humanos, compartilham de 40 a 63% de sua identidade nas sequências (Barnes e Sharp, 1999; Hannon e Hoyer, 2008; Romeiro *et al.*, 2003; Lanfumey *et al.*, 2000).

Receptores 5-HT_{1A}

No homem, o gene do receptor 5-HT_{1A} está localizado no cromossomo 5 (5q11.2 - q13) (Kobilka *et al.*, 1987; Drago, 2008; François, 2008; Savitz *et al.*, 2009) e codifica para uma proteína de 422 aminoácidos. O receptor apresenta uma estrutura típica de um receptor ligado à proteína G com um sítio N glicosilação localizado no domínio N terminal da proteína. Além disso, apresenta um sítio de consenso para a fosforilação pela proteína quinase C (PKC) na segunda e na terceira volta intracelular (Barnes e Sharp, 1999; Hannon e Hoyer, 2008).

A densidade de sítios de ligação dos receptores 5-HT_{1A} é maior nas regiões límbicas do cérebro, especialmente no hipocampo, septo lateral, áreas corticais (principalmente córtex cingulato e entorrinal) e também nos núcleos da rafe mesoencefálica (ambos médios e dorsais) (Barnes e Sharp, 1999; Romeiro *et al.*, 2003; Lanfumey *et al.*, 2000). Os receptores 5-HT_{1A} estão localizados em neurônios pós-sinápticos (na região frontal) e em neurônios pré-sinápticos serotoninérgicos, ao nível do soma e dendritos nos núcleos da rafe mesencefálica medular. Os subtipos de receptores localizados em neurônios pré-sinápticos se encontram nos corpos neuronais dos núcleos da rafe e atuam como auto-receptores somatodendríticos. Já os subtipos pós-sinápticos se localizam, principalmente, no sistema límbico e atuam como heterorreceptores. Esta dupla localização proporciona aos receptores 5-HT_{1A}, em sua excitação, um efeito duplo na estimulação serotoninérgica. Quando os neurônios serotoninérgicos pré-sinápticos são estimulados, ocorre a inibição da atividade elétrica dos neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe, reduzindo a liberação de serotonina. O estímulo dos receptores pós-sinápticos ativa a via de segundos mensageiros, completando a sinapse no sistema serotoninérgico (Esther Molina, 2009)

O padrão de distribuição dos receptores 5-HT_{1A} é similar entre as espécies, embora sua organização laminar em áreas hipocámpais e corticais nos homens seja um pouco diferente de roedores (Barnes e Sharp, 1999; Hannon e Hoyer, 2008; Romeiro *et al.*, 2003;). Nos núcleos da rafe, os receptores 5-HT_{1A} são somatodendríticos e atuam como autoreceptores inibindo o “disparo celular” (Hannon e Hoyer, 2008). Os 5-HT_{1A} pós-sinápticos estão presentes nas estruturas límbicas, principalmente no hipocampo. Esse subtipo de receptor faz a mediação da hiperpolarização neuronal, via proteína G ligada a canais de K (GIRK channels) e inibe o disparo neuronal bem como a liberação de serotonina (Barnes e Sharp, 1999; Hannon e Hoyer, 2008). Os receptores 5-HT_{1A} estão ligados a diferentes sistemas de efetores: enzimático, que produz a inibição da adenilil ciclase e dois efetores iônicos, que atuam na ativação de canais de potássio e na inibição de canais de cálcio. Ambos efetores são ligados aos receptores via proteína G₁ e G_o, que são subtipos de proteínas G (Lanfumeey *et al.*, 2000).

As respostas dos segundos mensageiros pela estimulação dos receptores 5-HT_{1A} pode ocorrer por sua ligação negativa à enzima adenilil ciclase via proteína G (Hannon e Hoyer, 2008). A reação que a adenilil ciclase catalisa é a conversão de ATP em AMPc (Adenosina monofosfato cíclico). O AMPc é uma molécula importante na transdução de sinais nos eucariotos e sua formação é inibida pela adenilil ciclase através da ativação dos receptores 5-HT_{1A} (Dumuis, 1987). A adenilil ciclase pode ser ativada ou inibida pela proteína G, na qual está ligada à membrana dos receptores. A atuação como segundo mensageiro do AMPc dá-se pela interação ou regulação de outras proteínas.

Receptores 5-HT₂

A família dos receptores 5-HT₂ pode ser dividida em três subtipos (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{2C}) que apresentam estruturas moleculares, farmacológicas e uma rota de transmissão de sinais similares (Barnes e Sharp, 1999). Os receptores 5-HT₂ ligam-se preferencialmente à proteína G_{q/11} aumentando inositol fosfato o Ca²⁺ citosólico, além de ter um papel importante na contração muscular e estimulação no cérebro. Os receptores 5-HT₂ podem também se ligar à proteína G_{12/13}, na qual são conhecidos por mediar em longo prazo mudanças estruturais nas células (Hannon e

Hoyer, 2008). As sequências de aminoácidos dos receptores 5-HT₂ apresentam um alto grau de homologia dentro dos sete domínios transmembrana, mas eles são estruturalmente distintos dos outros receptores 5-HT. Uma característica de todos os genes dos receptores 5-HT₂ é que eles possuem dois íntrons (5-HT_{2A} e 5-HT_{2B}) ou três íntrons (5-HT_{2C}), na sequência codificante (Barnes e Sharp, 1999; Hannon e Hoyer, 2008).

A localização dos receptores 5HT₂ é pós-sináptica e estão ligados à fosfolipase C, envolvidos na ativação de dois segundos mensageiros: diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃) (Salvi, *et al.*,1999). Acredita-se que esse tipo de receptor possa estar envolvido com várias doenças neuropsiquiátricas, aumentar a percepção à dor e mediar a contração dos músculos lisos dos intestinos. (Kim, *et al.*, 2000; Hemrick-Luecke, *et al* 1994; Tokunga, *et al.*, 1998 apud Pata, *et al.*, 2004)

Receptor 5-HT_{2A}

O receptor 5-HT_{2A} media a resposta contrátil em muitos músculos lisos vasculares, urinários, uterinos e brônquios. Além disso, a agregação de plaquetas e o aumento da permeabilidade capilar depois da exposição à 5-HT têm sido atribuídos aos receptores 5-HT_{2A} mediando essas funções. (Hannon e Hoyer, 2008)

Os receptores 5-HT_{2A} são um dos principais subtipos de receptores entre os ligados à proteína G (GPCRs), embora o 5-HT_{2A} possa também ter um efeito inibitório em certas áreas tais como córtex visual e o orbital. Por isso, foi dada uma primeira importância a esse receptor como alvo de drogas psicodélicas, como o LSD (Dietilamida do ácido lisérgico). Na literatura encontram-se estudos que indicam alguns efeitos problemáticos da ativação dos receptores 5-HT_{2A} no cérebro, causado pelo LSD e seus agonistas, tais como DOI, Pylocibim e outras substâncias psicodélicas que são alucinógenas e, eventualmente, acarretam efeitos psicóticos (Oekelen *et al.*, 2003).

Os receptores 5-HT_{2A} são amplamente distribuídos em todo o sistema nervoso central. São expressos próximos às áreas ricas em terminais serotoninérgicos,

incluindo o neocórtex (principalmente o perirfrontal, parietal e somatossensório) e tubérculos olfatórios. Há também uma maior concentração desse receptor nos dendritos apicais das células piramidais do córtex, que pode modular processos cognitivos (Barnes e Sharp, 1999;. Geurts, 2002; Maeshima, 1998; Maeshima, 2004). Os efeitos causados pela ativação desse receptor incluem: excitação neuronal, efeitos comportamentais, aprendizado, ansiedade, contração dos músculos lisos (trato gastrointestinal e brônquios) (Rang, 2003), vasoconstrição e vasodilatação, e na agregação de plaquetas.

Os receptores 5-HT_{2A} são ligados preferencialmente via proteína G_{q/11} à rota de cálcio, IP₃/PKC, embora a inibição da produção de AMPc tenha sido relatada (Oekelen *et al.*, 2003; Hannon e Hoyer, 2008). Esses receptores também são conhecidos pela ligação com a via de transdução de sinal pela proteína G_{αq}. Após a estimulação com o agonista do receptor, a subunidade G_{αq} e beta-gama dissociam-se para iniciar a rota do efetor *downstream*. O G_{αq} estimula a atividade da fosfolipase C que, posteriormente, promove a liberação de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃) que por sua vez, estimula a atividade da proteína quinase C (PKC) e a liberação de Ca²⁺. O diacilglicerol (DAG) é um glicerídeo composto por uma cadeia com dois ácidos graxos ligados covalentemente à molécula de glicerol através de ligações ésteres (Oekelen *et al.*, 2003; Urban, 2007). A ativação da PKC pelo DAG dá-se da seguinte maneira: o DAG funciona como um segundo mensageiro de sinalização lipídica e é um produto da hidrólise do fosfolipídio PIP₂ (fosfatil-inositol-bifosfato), um fosfolipídio que está localizado na membrana plasmática, pela enzima fosfolipase C que, através da mesma reação, produz inositol-tri-fosfato (IP₃). O IP₃ estimula a liberação de íons de cálcio do retículo endoplasmático liso, considerando que o DAG na membrana facilita a translocação da PKC do citosol para a membrana plasmática. O inositol-tri-fosfato junto com o DAG é uma molécula de segundo mensageiro usada na transdução de sinais nas células. Em seres humanos, suas principais funções são a mobilização de Ca²⁺, proliferação celular e outras reações celulares. Nos músculos lisos, ocorre o aumento da concentração de cálcio na célula, resultando na contração dos músculos (Oekelen *et al.*, 2003; Somlyo, 1994; Lehninger, 2006; Voet, 1995).

Gene do receptor de serotonina 5-HT_{1A}

Um polimorfismo de base única (Single Nucleotide Polymorphism – SNP) na região promotora no gene do receptor de serotonina 5-HT_{1A}, localizado no cromossomo 5 q11.2-13 (Kobilka *et al.*, 1987), denominado rs6295 (-1019C>G) (Wu e Comings, 1999), pode ser responsável pela alteração da expressão gênica desse receptor em seres humanos (Lemondé *et al.*, 2003; Czeak *et al.*, 2006). O SNP atua em um sítio de ligação, no gene do receptor, para um fator de transcrição NUDR (Nuclear Deformed Epidermal Autoregulatory Factor) que é o homólogo humano do Deaf-1 (Deformed Epidermal Autoregulatory Factor 1 - *Drosophila*), que foi identificado como uma proteína de ligação do DNA e um potencial gene regulador (Huggenvik *et al.*, 1998). O alelo C, quando presente, forma um sítio de ligação para o NUDR que reprime a atividade de transcrição do gene do receptor 5-HT_{1A}. Porém, com o alelo G, essa ligação não ocorre plenamente, levando a uma atividade anormal do receptor e, conseqüentemente, uma quantidade alterada de neurotransmissor disponível na fenda sináptica. (Lemondé *et al.*, 2003; Albert e Lemondé, 2004; François *et al.*, 2008; Savitz *et al.*, 2009) Ainda que os mecanismos que determinam a atividade do NUDR (Deaf-1) não estejam claros, tanto o seu aumento como a sua diminuição, foram relacionados com o alelo G. (François *et al.*, 2008)

Diversos estudos com o receptor 5-HT_{1A} tentam associar o polimorfismo (-1019C>G) com os transtornos de humor, com resultados ainda controversos. Lemondé *et al.* (2003) sugerem em seu estudo um novo modelo de transcrição no qual o alelo G(-1019) diminui a expressão do receptor 5-HT_{1A} reduzindo a neurotransmissão serotoninérgica, predispondo à depressão e ao suicídio. Os dados encontrados neste estudo são similares ao estudo de Lenze *et al.*, (2008), no qual o alelo G do polimorfismo do receptor 5-HT_{1A} foi associado com o aumento dos sintomas depressivos e uma baixa recuperação na escala IADLs (Instrumental Activities of Daily Living scale). Neste estudo, a baixa recuperação foi parcialmente explicada pelos escores de depressão, sugerindo que os sintomas depressivos podem mediar parcialmente a recuperação. WU *et al.* (2008) também sugere que o polimorfismo (-1019C>G) do receptor 5-HT_{1A} esteja provavelmente associado com depressão maior (DM), e é provável que seja um locus de suscetibilidade no gene

para mulheres com início tardio de DM. Entretanto, contrariando muitos estudos, o genótipo GG foi menos associado com o transtorno na amostra estudada. Em um estudo com análises de PET (Positron Emission Tomography Study), compararam-se controles com pacientes depressivos livre de medicação e observou-se o genótipo GG associado à depressão (Parsey *et al.*, 2006).

Em pesquisas com medicamentos, Hong *et al.* (2006) associou o alelo G com uma resposta negativa ao tratamento com Fluoxetina em pacientes chineses com depressão maior. Em outro estudo, os pacientes com depressão maior tratados com Citalopram também tiveram uma resposta negativa ao tratamento, nos indivíduos portadores do alelo G associado ao alelo curto do HTTLPR (Arias *et al.*, (2005). Em contraste, Hettema *et al.* (2008) sugere em seu estudo que o gene do 5-HT_{1A} pode não ter uma função importante na suscetibilidade genética para os fenótipos de depressão e ansiedade.

Há poucos estudos de associação analisando o polimorfismo rs6295 (-1019C>G) com comportamento suicida, e os que foram realizados apresentam resultados controversos. As evidências encontradas por Stockmeier *et al.*, (1998) indicam que a depressão maior, suicídio ou a combinação desses dois fatores estão relacionadas a um significativo aumento nos receptores 5-HT_{1A}. Pitchot *et al.*, (2005) estudaram 40 pacientes internados com depressão maior divididos em dois subgrupos: 20 indivíduos com tentativa de suicídio e 20 sem tentativa de suicídio, e comparou com um grupo controle, pareados por gênero e idade. Este estudo tende a confirmar a função da serotonina e, mais especificamente, a função dos receptores 5-HT_{1A} na biologia do comportamento suicida na depressão maior. Wasserman *et al.*, (2006) mostraram que a variação do polimorfismo (-1019C>G) no gene do receptor 5-HT_{1A} não está associada com as tentativas de suicídio em geral. No entanto, ele sugere que os resultados indicam uma possível função do alelo G no comportamento suicida em conexão com grande exposição a traumas ou eventos de vida adversos e/ou traumáticos. O estudo de Serretti *et al.*, (2007) não confirmou em sua amostra a idéia de que as variantes genéticas do 5-HT_{1A} sejam os principais contribuintes para o suicídio, raiva, agressividade ou comportamentos relacionados com sua amostra.

Outros estudos como o de Freitag (2006), que analisou o polimorfismo (-1019C>G) em uma amostra de 115 pacientes com transtorno do pânico e 115 controles, verificaram uma associação do genótipo GG com o transtorno do pânico quando considerado junto com o polimorfismo da COMT. Rothe *et al.*, (2004) estudou 134 pacientes caucasianos e 134 controles, associando o alelo G com o transtorno do pânico com agorafobia. Savitz *et al.*, (2009) mostrou que o alelo G do polimorfismo (-1019C>G) do receptor 5-HT_{1A} tem sido apresentado com um regulador positivo da expressão do receptor na rafe, mas diminui a expressão do receptor 5-HT_{1A} pós-sináptico, talvez explicando porque a variante G é superexpressada em algumas amostras de pacientes com DM. No entanto, contradições em estudos farmacológicos, *post-mortem*, PET e genéticos podem ser encontrados na literatura, mostrando a complexidade do sistema de sinalização dos receptores 5-HT_{1A}.

Gene do receptor de serotonina 5-HT_{2A}

O gene do receptor 5-HT_{2A} está localizado, no homem, no cromossomo 13 q14 – q21 e possui três exons e dois íntrons, com um tamanho de 20 Kb (Saltzman. *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1992; Rothe *et al.*, 2004; Barnes e Sharp, 1999; Hannon e Hoyer, 2008). O polimorfismo do tipo SNP (Single Nucleotide Polymorphism) ocorre no éxon 1 na posição 102, sendo uma troca T para C (T102C) (Warren *et al.*, 1993). O polimorfismo não resulta em alteração na sequência de aminoácidos da proteína, mesmo assim, há uma forte associação do polimorfismo T102C com depressão maior e esquizofrenia (Pata, *et al.*, 2004).

Em um estudo caso-controle, (Du *et al.*, 2000) encontrou uma associação significativa com o alelo C do polimorfismo (T102C) e o transtorno depressivo maior. A frequência encontrada para o alelo C foi significativamente maior em pacientes com ideação suicida. Estas descobertas feitas por Du confirmam a hipótese de que a variação polimórfica possa ser um fator de suscetibilidade para a depressão maior e ideação suicida. Além disso, um estudo com uma amostra de espanhóis confirmou os resultados encontrados por Du *et al.*, (2000), sugerindo que os pacientes com depressão, portadores do alelo C (T102C), apresentam um risco maior para o

comportamento suicida (Arias *et al.*, 2001). Pandey e colegas (2002) sugerem em seu estudo que o número de sítios de ligações dos receptores 5-HT_{2A} no córtex pré-frontal de adolescentes que cometeram suicídio seja maior em relação a sujeitos normais. Além disso, a expressão do gene do receptor 5-HT_{2A} e sua proteína no córtex pré-frontal e hipocampo foram maiores, mas não no núcleo acumbens, de adolescentes que cometeram suicídio, em relação a um grupo controle. Estudos *post-mortem* têm encontrado um aumento no número de receptores 5-HT_{2A} no cérebro de pacientes com depressão e que se suicidaram, embora os resultados ainda sejam controversos (Catapano, 2007). Vaquero-Lorenzo (2008) sugere no seu estudo que o polimorfismo T102C possa estar associado à tentativa de suicídio e/ou transtornos psiquiátricos, enquanto que o outro polimorfismo estudado pelo autor C1354T (Hys452Tyr) não confirmou a mesma associação. Em estudos com inibidores seletivos de serotonina (SSRIs), em uma amostra de Japoneses e Italianos, foi levantada a hipótese de que a melhoria nos sintomas pode ser, pelo menos em parte, geneticamente controlada. E que o polimorfismo T102C possa exercer certa influencia na resposta aos SSRIs (Kato *et al.*, 2008) Outra pesquisa com uma amostra de japoneses com transtorno depressivo maior sugere que os receptores 5-HT_{2A} possam ter uma função patofisiológica importante na resposta terapêutica aos SSRIs (Kishi *et al.*, 2009).

Apesar de muitas evidências, os estudos com os receptores 5-HT_{2A} ainda apresentam-se controversos. Khait e colegas (2005), em uma amostra com apenas caucasianos de origem européia, não encontraram associação entre o polimorfismo T102C do receptor de serotonina e transtornos de humor e suicídio, demonstrando uma associação com o genótipo TT com um aumento no número de receptores 5-HT_{2A} nas plaquetas dos sujeitos saudáveis, mas aparentemente não nos sujeitos com transtorno de humor. Um estudo realizado com pacientes com transtorno obsessivo compulsivo (TOC), não conseguiu encontrar associação entre os polimorfismos do receptor de serotonina 5-HT_{2A} (T102C) e (-1438G>A) com o transtorno obsessivo compulsivo (Squenel, 2003). Rothe *et al.*, (2004) tentou replicar o estudo de Inada *et al.*, (2003), com uma amostra de canadenses e alemães, mas não foi encontrada associação entre o polimorfismo T102C do receptor 5-HT_{2A} e transtorno do pânico. Existem muitas controvérsias nos resultados dos estudos que tentam relacionar o polimorfismo T102C e o comportamento suicida (Ono *et al.*,

2001; Arango *et al.*, 2003; Yoon *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008) Pode-se ainda encontrar estudos que tentam associar os receptores 5-HT_{2A} com resposta à medicamentos, pois são muito importantes no controle de ambas as sintomatologias psicótica e depressiva, sendo um dos principais alvos de inibidores de muitos antipsicóticos e antidepressivos. (Aghajanian and Sanders-Bush, 2002; Miyamoto *et al.*, 2002)

Objetivos

Geral

Verificar a frequência das variantes polimórficas dos receptores de serotonina 5-HT_{1A} (rs6295) e 5-HT_{2A} (rs6313), em pacientes deprimidos que tentaram o suicídio e em um grupo controle sem doença psiquiátrica.

Específicos

Calcular e comparar a frequência dos genótipos e dos alelos T/C (rs6313) e C/G (rs6295), nos pacientes e no grupo controle;

Verificar se há associação entre as frequências dos polimorfismos descritos e o diagnóstico psiquiátrico de episódio de depressão maior.

Considerações Éticas

Os pacientes que receberam atendimento global (clínico, cirúrgico, psicológico e psiquiátrico) no Hospital de Pronto Socorro após uma tentativa de suicídio foram convidados a participar do estudo em questão, informados dos objetivos, riscos e benefícios do mesmo para o paciente e para sua família. Os pacientes selecionados foram expostos a um risco mínimo, considerando o procedimento pouco invasivo necessário para sua realização. Todos os pacientes preencheram termo de consentimento informado, em que constava a possibilidade de utilização do material em outros projetos de pesquisa para outros genes candidatos. Foi oferecido para os indivíduos pesquisados e seus familiares um atendimento para esclarecimento de eventuais dúvidas quanto ao resultado e significado deste exame e dos possíveis impactos ou riscos que estejam envolvidos para os pacientes e suas famílias. Só participaram do estudo aqueles pacientes que tiveram condições de entender e consentir com os procedimentos realizados.

Referências

AGHAJANIAN, G.K., SANDERS-BUSH, E. Serotonin. In: Davis, K.L., Charney, D., Coyle, J.T., Nemeroff, C. (Eds.), *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 15–34, , 2002.

AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM – IV)*. 4. ed. Washington, 1994.

ALLEN, M. H. et al. Contributors to suicidal ideation among bipolar patients with and without a history of suicide attempts. *Suicide and Life-Threatening Behavior [S.I.]*, v. 35, n. 6, p. 671-680, 2005.

ARANGO V., et al., Genetics of the serotonergic system in suicidal behavior. *Journal of Psychiatric Research* 37 (5) 375-386, 2003.

ARIAS, B. et al. Evidence for a combined genetic effect of the 5-HT1A receptor and serotonin transporter genes in the clinical outcome of major depressive patients treated with citalopram. *Journal of Psychopharmacology [S.I.]*, v. 19, n. 2, p. 166-172, 2005.

ARIAS, B. et al., The 5-HT2A Receptor Gene 102T/C Polymorphism Is Associated With Suicidal Behavior in Depressed Patients. *American Journal of Medical Genetics*, v. 105 p. 801-804, 2001.

ASBERG, M. et al. 5-HIAA IN CEREBROSPINAL-FLUID - BIOCHEMICAL SUICIDE PREDICTOR. *Archives of General Psychiatry [S.I.]*, v. 33, n. 10, p. 1193-1197, 1976.

BACA-GARCIA, E. et al. A pilot study on differences in aggression in New York City and Madrid, Spain, and their possible impact on suicidal behavior. *Journal of Clinical Psychiatry [S.I.]*, v. 67, n. 3, p. 375-380, 2006.

BAH, J. et al. Serotonin transporter gene polymorphisms: Effect on serotonin transporter availability in the brain of suicide attempters. *Psychiatry Research-Neuroimaging* [S.I.], v. 162, n. 3, p. 221-229, 2008.

BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* [S.I.], v. 38, n. 8, p. 1083-1152, 1999.

BLAIR-WEST, G. W. et al. Lifetime suicide risk in major depression: sex and age determinants. *Journal of Affective Disorders* [S.I.], v. 55, n. 2-3, p. 171-178, 1999.

BOTEGA N.J. Suicídio e tentativa de Suicídio. In: Beny Lafer, Osvaldo P. Almeida, Renério Fráguas Jr., Eurípedes C. Miguel (Org) *Depressão no Ciclo Vital*, pág 157-165 Porto Alegre: ArtMed, 2000.

BOTTLENDER, R. et al. Suicidality in bipolar compared to unipolar depressed inpatients. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* [S.I.], v. 250, n. 5, p. 257-261, 2000.

BRENT, D. A. et al. Suicidal behavior runs in families - A controlled family study of adolescent suicide victims. *Archives of General Psychiatry* [S.I.], v. 53, n. 12, p. 1145-1152, 1996.

_____. Familial pathways to early-onset suicide attempt - Risk for suicidal behavior in offspring of mood-disordered suicide attempters. *Archives of General Psychiatry* [S.I.], v. 59, n. 9, p. 801-807, 2002.

CARTER, T. D. C. et al. Early age at onset as a risk factor for poor outcome of bipolar disorder. *Journal of Psychiatric Research* [S.I.], v. 37, n. 4, p. 297-303, 2003.

CATAPANO L.A. G Protein-Coupled Receptors in Major Psychiatric Disorders. *Biochim Biophys Acta*, v. 1768(4) p. 976–993, 2007.

CHEN, K. et al. The human 5-HT₂ receptor is encoded by a multiple intron-exon gene. *Mol. Brain Res*, v. 14, p. 20–26, 1992.

COOPER, J. R.; MELCER, I. ENZYMIC OXIDATION OF TRYPTOPHAN TO 5-HYDROXYTRYPTOPHAN IN BIOSYNTHESIS OF SEROTONIN. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* [S.I.], v. 132, n. 3, p. 265-&, 1961.

CZESAK, M. et al. Cell-specific repressor or enhancer activities of Deaf-1 at a serotonin 1A receptor gene polymorphism. *Journal of Neuroscience* [S.I.], v. 26, n. 6, p. 1864-1871, 2006.

DAVID, N.L. *Lehninger principles of biochemistry, Princípios de bioquímica. Português. 4 ed., São Paulo, Ed. Sarvier, p. 1202, 2006.*

DE LUCA, V. et al. Association study of a novel functional polymorphism of the serotonin transporter gene in bipolar disorder and suicidal behaviour. *Psychopharmacology* [S.I.], v. 182, n. 1, p. 128-131, 2005.

DRAGO, A. et al. 5-HT_{1A} gene variants and psychiatric disorders a review of current literature and selection of SNPs for future studies. *International Journal of Neuropsychopharmacology* [S.I.], v. 11, n. 5, p. 701-721, 2008.

DU, L. et al., Association of Polymorphism of Serotonin 2A Receptor Gene With Suicidal Ideation in Major Depressive Disorder. *American Journal of Medical Genetics*, v. 96 p.56–60, 2000.

DUMUIS, A., SEBBEN, M., BOCKAERT, J. Pharmacology of 5-Hydroxytryptamine-1 A receptors Which Inhibit cAMP Production in Hippocampal and Cortical Neurons in Primary Culture. *Molecular Pharmacology*, v. 33, p. 178186, 1987.

DWIVEDI, Y. Brain-derived neurotrophic factor: role in depression and suicide. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, v. 5, p.433–449, 2009.

FRANK, E. et al. Clinical significance of lifetime panic spectrum symptoms in the treatment of patients with bipolar I disorder. *Archives of General Psychiatry* [S.I.], v. 59, n. 10, p. 905-911, 2002.

FREITAG CM, et al. Interaction of serotonergic and noradrenergic gene variants in panic disorder. *Psychiatric Genetics*, v. 16, p. 59–65, 2006.

GARCIA L. F. et al. Incremental effect for antisocial personality disorder genetic risk combining 5-HTTLPR and 5-HTTVNTR polymorphisms. *Psychiatry Research*, v.177, p.161–166, 2010.

GEURTS, F. J. et al. Localization of 5-HT_{2A}, 5-HT₃, 5-HT_{5A} and 5-HT₇ receptor-like immunoreactivity in the rat cerebellum. *Journal of Chemical Neuroanatomy [S.I.]*, v. 24, n. 1, p. 65-74, 2002.

HAI-YIN Z. et al., Serotonin_{2A} Receptor Gene Polymorphism in Mood Disorders. *British Journal of Psychiatry*, v.41 p. 768—773, 1997.

HANNON, J.; HOYER, D. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behavioural Brain Research [S.I.]*, v. 195, n. 1, p. 198-213, Dec 2008.

HARIRI, A. R.; WEINBERGER, D. R. Functional neuroimaging of genetic variation in serotonergic neurotransmission. *Genes Brain and Behavior [S.I.]*, v. 2, n. 6, p. 341-349, 2003.

HARRIS C, BARRACLOUGH B. Suicide as an outcome for mental disorders. *British Journal of Psychiatry* 170:205-228,1997.

HAUACHE O.M. Receptores Acoplados à Proteína G: Implicações para a Fisiologia e Doenças Endócrinas. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 45 n. 3, 2001.

HENNINGSSON, S. et al. Genetic Variation in Brain-Derived Neurotrophic Factor Is Associated with Serotonin Transporter but Not Serotonin-1A Receptor Availability in Men. *Biological Psychiatry [S.I.]*, v. 66, n. 5, p. 477-485, 2009.

HETTEMA, J. M. et al. Association study between the serotonin 1A receptor (HTR1A) gene and neuroticism, major depression, and anxiety disorders. *American Journal of Medical Genetics Part B-Neuropsychiatric Genetics* [S.I.], v. 147B, n. 5, p. 661-666, 2008.

HONG CJ, CHEN TJ, YU YW, TSAI SJ. Response to fluoxetine and serotonin 1A receptor (C-1019G) polymorphism in Taiwan Chinese major depressive disorder. *Pharmacogenomics Journal*, v.6, p. 27–33, 2006.

HUANG, Y. Y. et al. Human 5-HT1A receptor C(-1019)G polymorphism and psychopathology. *International Journal of Neuropsychopharmacology* [S.I.], v. 7, n. 4, p. 441-451, 2004.

HUGGENVIK, J. I. et al. Characterization of a nuclear deformed epidermal autoregulatory factor-1 (DEAF-1)-related (NUDR) transcriptional regulator protein. *Molecular Endocrinology* [S.I.], v. 12, n. 10, p. 1619-1639, 1998.

INADA Y, et al. Positive association between panic disorder and polymorphism of the serotonin 2A receptor gene. *Psychiatry Research*, v. 118, p. 25–31, (2003).

JAMISON K.R. *Quando a noite cai – Entendendo o Suicídio*. Rio de Janeiro: Gryphus, 2002.

JULIUS, D. MOLECULAR-BIOLOGY OF SEROTONIN RECEPTORS. *Annual Review of Neuroscience* [S.I.], v. 14, p. 335-360, 1991.

KAPCZINSKI, F. Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos. In: QUEVEDO, J. (Ed.). v. 2. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 503.

KATO M. et al., Effect of 5-HT1A Gene Polymorphisms on Antidepressant Response in Major Depressive Disorder. *AMERICAN JOURNAL OF MEDICAL GENETICS PART B*, 150, p.115–123, 2008.

KELTIKANGAS-JÄRVINEN L. et al., Serotonin receptor genes 5HT1A and 5HT2A modify the relation between childhood temperament and adulthood hostility. *Genes Brain and Behavior*, v.7 p. 46–52, 2008.

Khait V.D. et al., Association of Serotonin 5-HT2A Receptor Binding and the T102C Polymorphism in Depressed and Healthy Caucasian Subjects. *Neuropsychopharmacology*, v. 30, p. 166–172, 2005.

KISHI T. et al., HTR2A is Associated with SSRI Response in Major Depressive Disorder in a Japanese Cohort. *Neuromol Med*, 2009.

KOBILKA, B. K. et al. AN INTRONLESS GENE ENCODING A POTENTIAL MEMBER OF THE FAMILY OF RECEPTORS COUPLED TO GUANINE-NUCLEOTIDE REGULATORY PROTEINS. *Nature [S.I.]*, v. 329, n. 6134, p. 75-79, 1987.

LANFUMEY L., HAMON, M. Central 5HT1A Receptors: Regional Distribution and Functional Characteristics. *Nuclear Medicine & Biology*, v.27, p. 429-435, 2000.

LE FRANCOIS, B. et al. Transcriptional regulation at a HTR1A polymorphism associated with mental illness. *Neuropharmacology [S.I.]*, v. 55, n. 6, p. 977-985, 2008.

LEMONDE, S. et al. Association of the C(-1019)G 5-HT1A functional promoter polymorphism with antidepressant response. *International Journal of Neuropsychopharmacology [S.I.]*, v. 7, n. 4, p. 501-506, 2004.

_____. Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide. *Journal of Neuroscience [S.I.]*, v. 23, n. 25, p. 8788-8799, 2003.

LENZE, E. J. et al. Association of serotonin-1A and 2A receptor promoter polymorphisms with depressive symptoms and functional recovery in elderly persons after hip fracture. *Journal of Affective Disorders [S.I.]*, v. 111, n. 1, p. 61-66, 2008.

LESCH, K. P. et al. ORGANIZATION OF THE HUMAN SEROTONIN TRANSPORTER GENE. *Journal of Neural Transmission-General Section* [S.I.], v. 95, n. 2, p. 157-162, 1994.

LEUCHTER, A. F. et al. Monoamine Oxidase A and Catechol-O-Methyl-transferase Functional Polymorphisms and the Placebo Response in Major Depressive Disorder. *Journal of Clinical Psychopharmacology* [S.I.], v. 29, n. 4, p. 372-377, 2009.

MAESHIMA, T. et al. Expression of serotonin(2A) receptors in Purkinje cells of the developing rat cerebellum. *Neuroscience Research* [S.I.], v. 50, n. 4, p. 411-417, 2004.

_____. Serotonin(2A) receptor-like immunoreactivity in rat cerebellar Purkinje cells. *Neuroscience Letters* [S.I.], v. 252, n. 1, p. 72-74, 1998.

MALONE, K. M. et al. MAJOR DEPRESSION AND THE RISK OF ATTEMPTED-SUICIDE. *Journal of Affective Disorders* [S.I.], v. 34, n. 3, p. 173-185, 1995.

MANN, J. J. The neurobiology of suicide. *Nature Medicine* [S.I.], v. 4, n. 1, p. 25-30, 1998.

_____. Neurobiology of suicidal behaviour. *Nature Reviews Neuroscience* [S.I.], v. 4, n. 10, p. 819-828, 2003.

MANN, J. J. et al. The neurobiology and genetics of suicide and attempted suicide: A focus on the serotonergic system. *Neuropsychopharmacology* [S.I.], v. 24, n. 5, p. 467-477, 2001.

_____. The neurobiology of suicide risk: A review for the clinician. *Journal of Clinical Psychiatry* [S.I.], v. 60, p. 7-11, 1999.

_____. Toward a clinical model of suicidal behavior in psychiatric patients. *American Journal of Psychiatry* [S.I.], v. 156, n. 2, p. 181-189, 1999.

MELHEM, N. M. et al. Familial pathways to early-onset suicidal behavior: Familial and individual antecedents of suicidal behavior. *American Journal of Psychiatry* [S.I.], v. 164, n. 9, p. 1364-1370, 2007.

MILLER AS, DYKES DD, POLESKY HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16(3): 1215, 1988.

MIYAMOTO, S., et al. Therapeutics of schizophrenia. In: Davis, K.L., Charney, D., Coyle, J.T., Nemeroff, C. (Eds.), *Neuropsychopharmacology: the Fifth Generation of Progress*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 775–807, 2002.

MOLINA RIVAS E. Variabilidad Genética y Estrés Psicosocial Prévio Como Determinantes Prospectivos de depresión-Análisis Longitudinal Del Estúdio PREDICT-Gene. 2009. p.394. Tese de Doutorado – Instituto de Neurociências “Federico Olóriz” Universidade de Granada. Granada. Junio 2009.

OEKELEN D.V., et al., Luyten W.H.M.L., Leysen J.E. 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors and their atypical regulation properties. *Life Sciences*, v. 72, p. 2429–2449, 2003.

OLDENDORF, W. H.; SZABO, J. AMINO-ACID ASSIGNMENT TO ONE OF 3 BLOOD-BRAIN-BARRIER AMINO-ACID CARRIERS. *American Journal of Physiology* [S.I.], v. 230, n. 1, p. 94-98, 1976.

ONO H, et al., Serotonin 2A receptor gene polymorphism is not associated with completed suicide. *Journal of Psychiatric Research* 35, 173-176, 2001.

OQUENDO, M. A. et al. Sex differences in clinical predictors of suicidal acts after major depression: A prospective study. *American Journal of Psychiatry* [S.I.], v. 164, n. 1, p. 134-141, 2007.

_____. Suicidal behavior in bipolar mood disorder: clinical characteristics of attempters and nonattempters. *Journal of Affective Disorders* [S.I.], v. 59, n. 2, p. 107-117, 2000.

PANDEY, G.N. et al., Higher Expression of Serotonin 5-HT_{2A} Receptors in the Postmortem Brains of Teenage Suicide Victims. *Am J Psychiatry*, v.159 p. 419–429, 2002.

PARSEY, R. V. et al. Altered serotonin 1A binding in major depression: A carbonyl-¹¹C-WAY100635 positron emission tomography study. *Biological Psychiatry [S.l.]*, v. 59, n. 2, p. 106-113, 2006.

PATA C. et al. Association of the 1438 G/A and 102 T/C Polymorphism of the 5-HT_{2A} Receptor Gene with Irritable Bowel Syndrome 5-HT_{2A} Gene Polymorphism in Irritable Bowel Syndrome; *Clin Gastroenterol.* v. 38, n. 7, 2004.

PERROUD, N. et al. Simultaneous Analysis of Serotonin Transporter, Tryptophan Hydroxylase 1 and 2 Gene Expression in the Ventral Prefrontal Cortex of Suicide Victims. *Am J Med Genet Part B* , v.153, p.909–918, 2009.

PITCHOT, W. et al. 5-hydroxytryptamine 1A receptors, major depression, and suicidal behavior. *Biological Psychiatry [S.l.]*, v. 58, n. 11, p. 854-858, 2005.

PORTER, R. J. et al. Tryptophan hydroxylase gene (TPHI) and peripheral tryptophan levels in depression. *Journal of Affective Disorders [S.l.]*, v. 109, n. 1-2, p. 209-212, 2008.

PUJOL, C. Análise do polimorfismo A218C no gene da triptofano hidroxilase em pacientes deprimido que tentaram o suicídio. 2009. p.155. Dissertação de Mestrado – FACULDADE DE MEDICINA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS UFRGS. Porto Alegre. Outubro 2006.

ROMEIRO, L. A. S. et al. New therapeutical approaches for the treatment of depression: A medicinal chemistry view. *Quimica Nova [S.l.]*, v. 26, n. 3, p. 347-358, 2003.

ROTHER, C. et al. Association of a functional -1019C > G 5-HT1A receptor gene polymorphism with panic disorder with agoraphobia. *International Journal of Neuropsychopharmacology* [S.I.], v. 7, n. 2, p. 189-192, 2004.

ROY A. Family history of suicide. *Archives of General Psychiatry*, 40, 971-974, 1983.

ROY, A. et al. Genetics of suicide in depression. *Journal of Clinical Psychiatry* [S.I.], v. 60, p. 12-17, 1999.

ROY A. Psychiatric Emergencies. In: Kaplan, H.I.; Sadock, B.J. *Comprehensive Textbook of Psychiatry*, 7 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2031-2040, 2000.

ROY A. and Segal N. Suicidal Behaviour in twins: a replication. *Journal of Affective Disorders* 66, 71-74, 2001.

SALTZMAN, A.G. et al. Cloning of the human serotonin 5-HT2 and 5-HT1C receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. v. 181*, p.1469–1478, 1991.

SALVI R., DIAS R. D., KAPCZINSKI F.; Redução do tempo de latência para o efeito antidepressivo pela administração de pindolol; *Rev. Psiq. Clin.* 26 (3) 1999.

SAVITZ, J. et al. 5-HT1A receptor function in major depressive disorder. *Progress in Neurobiology* [S.I.], v. 88, n. 1, p. 17-31, 2009.

SCHENKEL L. C. et al. The BDNF Val66Met polymorphism is an independent risk factor for high lethality in suicide attempts of depressed patients. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, p. 5, 2010.

SEGAL, J. et al. Association between suicide attempts in south Brazilian depressed patients with the serotonin transporter polymorphism. *Psychiatry Research* [S.I.], v. 143, n. 2-3, p. 289-291, 2006.

SEGAL, J. Aspectos Genéticos do Comportamento Suicida. 2009. p.70. Tese de Doutorado – FACULDADE DE MEDICINA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS: PSIQUIATRIA UFRGS. Porto Alegre. Janeiro 2009.

SERRETTI, A. et al. HTR2C and HTR1A gene variants in German and Italian suicide attempters and completers. American Journal of Medical Genetics Part B- Neuropsychiatric Genetics [S.I.], v. 144B, n. 3, p. 291-299, 2007.

SHEEHAN, D. V. et al. The Mini-International Neuropsychiatric Interview (MINI): The development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10. Journal of Clinical Psychiatry [S.I.], v. 59, p. 22-33, 1998.

SHER, L. et al. Risk of suicide in mood disorders. Clinical Neuroscience Research [S.I.], v. 1, n. 5, p. 337-344, 2001a.

STAHL S. M. Psicofarmacologia – Base Neurocientífica e Aplicações Práticas, 2ª Ed., Rio de Janeiro: MEDSI, 2002.

SIM (Sistema de Informação de mortalidade) – Estatísticas de Saúde: Mortalidade 2007. Secretaria da Saúde do Rio Grande do Sul. Vol. 32, 200p. Porto Alegre, 2008.

SOLOMON A.. O Demônio do Meio – Dia – Uma anatomia da Depressão. Rio de Janeiro: Objetiva, 2002.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. SIGNAL-TRANSDUCTION AND REGULATION IN SMOOTH-MUSCLE (VOL 372, PG 231, 1994). Nature [S.I.], v. 372, n. 6508, p. 812-812, 1994.

SQENEL T. et al., T102C and –1438 G/A polymorphisms of the 5-HT2A receptor gene in Turkish patients with obsessive–compulsive disorder. European Psychiatry, v. 18, p. 249–254, 2003.

STAHL S. M. Psicofarmacologia – Base Neurocientífica e Aplicações Práticas, 2ª Ed., Rio de Janeiro: MEDSI, 2002.

STOCKMEIER, C. A. et al. Increase in serotonin-1A autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression - Postmortem evidence for decreased serotonin activity. *Journal of Neuroscience* [S.I.], v. 18, n. 18, p. 7394-7401, 1998.

TONDO L., BALDESSARINI R. J., 2001. Suicide: An Overview. Available at: <http://psychiatry.medscape.com/medscape/psychiatry/clinicalMgmt/CM.v03/public/index-CM.v03.html>

TURECKI, G. Suicidal behavior: is there a genetic predisposition? *Bipolar Disorders* [S.I.], v. 3, n. 6, p. 335-349, 2001.

URBAN, J. D. et al. Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* [S.I.], v. 320, n. 1, p. 1-13, 2007.

VAQUERO-LORENZO C. et al., Association Study of Two Polymorphisms of the Serotonin-2A Receptor Gene and Suicide Attempts. *American Journal of Medical Genetics Part B*, 147, p.645–649, 2008.

VOET, D., VOET JUDITH G. *Biochemistry*. Second Edition. ed. New York: John Wiley & Sons, INC, 1995.

VORACEK, M.; LOIBL, L. M. Genetics of suicide: a systematic review of twin studies. *Wiener Klinische Wochenschrift* [S.I.], v. 119, p. 463-475, 2007.

WARREN J.T. et al. An MspI polymorphism in the human serotonin receptor gene (HT2A): detection by DGGE and RFLP analysis. *Hum. Mol. Genet.*, v2, p. 338, 1993.

WASSERMAN D. et al., The serotonin 1A receptor C(-1019)G polymorphism in relation to suicide attempt. *Behavioral and Brain Functions*, v. 2 p.14, 2006.

WELLS, T.T. BEEVERS, C.G. MCGEARY, J.E. Serotonin transporter and BDNF genetic variants interact to predict cognitive reactivity in healthy adults. *Journal of Affective Disorders*, JAD-04550, p. 7, 2010.

WENDER, P. H. et al. PSYCHIATRIC-DISORDERS IN THE BIOLOGICAL AND ADOPTIVE FAMILIES OF ADOPTED INDIVIDUALS WITH AFFECTIVE-DISORDERS. Archives of General Psychiatry [S.I.], v. 43, n. 10, p. 923-929, 1986.

WERLANG B.G, BOTEGA N.J. Comportamento Suicida. Porto Alegre: Artmed, 2004.

World Health Organization, WHO. Figures and facts about suicide. Geneva, 1999.

WU, S.; COMINGS, D. E. A common C-1018G polymorphism in the human 5-HT1A receptor gene. Psychiatric Genetics [S.I.], v. 9, n. 2, p. 105-106, 1999.

WU, Y. et al. Association between the serotonin 1A receptor (C-1019)G polymorphism and major depressive disorder in the northern Han ethnic group in China. Chinese Medical Journal [S.I.], v. 121, n. 10, p. 874-876, 2008.

XIAN-ZHANG, HU. et.al. Serotonin Transporter Promoter Gain-of-Function Genotypes Are Linked to Obsessive-Compulsive Disorder. The American Journal of Human Genetics, v. 78, 2006.

YOON HK, KIM YK. Association between serotonin-related gene polymorphisms and suicidal behavior in depressive patients. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry Jul 1;32(5):1293-7, 2008.

ZEMBRZUSKI, V. M. et al. Application of an African ancestry index as a genomic control approach in a Brazilian population. Annals of Human Genetics [S.I.], v. 70, p. 822-828, Nov 2006.

ZHANG J, et al., Lack of association between three serotonin genes and suicidal behavior in Chinese psychiatric patients. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry Feb 15 ;32(2) :467-71, 2008.

ZHANG, K. R. et al. 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* [S.I.], v. 114, n. 1-3, p. 224-231, 2009.

ZHANG, X. et al. Functional polymorphisms of the brain serotonin synthesizing enzyme tryptophan hydroxylase-2. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 63, 2006.

Artigo 1 – Submetido a Revista Journal of Psychiatric Research em 26 Abril de 2010

De: ees.jpsychiatrres.b.8a320.c7fc894e@eesmail.elsevier.com
[mailto:ees.jpsychiatrres.b.8a320.c7fc894e@eesmail.elsevier.com] Em nome de
Rebecca Wyse
Enviada em: terça-feira, 27 de abril de 2010 11:44
Para: Sandra Leistner Segal
Assunto: A manuscript number has been assigned

Ms. Ref. No.: JPR2196
Title: Evidence of association between 5-HT1A variants and depressed men who
attempted suicide
Journal of Psychiatric Research

Dear Sandra,

Your submission entitled "Evidence of association between 5-HT1A variants and
depressed men who attempted suicide" has been assigned the following
manuscript number: JPR2196.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial
System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/jpsychiatrres/>.

Your username is: ssegal
If you need to retrieve password details, please go to:
http://ees.elsevier.com/jpsychiatrres/automail_query.asp

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Ms Rebecca Wyse
American Editorial Office
Journal of Psychiatric Research

Evidence of association between 5-HT_{1A} variants and depressed men who attempted suicide

Authors:

Rafael Rebelo e Silva^a, Jair Segal^b, Giovanni Abrahão Salum^c, Carolina Blaya^c, Gisele Gus Manfro^c, Sandra Leistner-Segal^{a,d}

a. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Post-Graduate Program in Medicine: Medical Sciences:, Brazil.

b. Hospital de Pronto Socorro de Porto Alegre (HPS), Brazil.

c. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Anxiety Disorder Program, Brazil.

d. Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Medical Genetics Service, Brazil.

*Correspondence to:

Sandra Leistner-Segal
Hospital de Clínicas de Porto Alegre,
Medical Genetics Service
Rua Ramiro Barcelos, 2350
CEP 90035-903
Porto Alegre - RS - Brazil
Tel.: +55 51 33598011; fax: +55 51 33598010.

E-mail address: ssegal@hcpa.ufrgs.br

Abstract

The 5-HT_{1A} receptors are present in many brain regions. A single Nucleotide Polymorphism (SNP) located in the promoter region of 5-HT_{1A} receptor gene could be responsible for the receptor genetic expression regulation in humans. The aim of this study was to verify the possible influence of rs6295 (-1019 C>G) polymorphism in depressive patients, from south of Brazil who attempted suicide, and compare them to a control group. The case population studied consisted of patients admitted to the Emergency Hospital of Porto Alegre (Hospital de Pronto Socorro - HPS) for serious suicide attempts. The control group was a convenience sample composed by employees of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) without psychiatric disorders. This is a case-control study where subjects were cautiously paired by sex and age and Amplification Refractory Mutation System (ARMS-PCR) was performed for DNA analysis. There are significant differences if we consider having at least one copy of G allele in the dominant model. We explored our analysis aiming to evaluate whether the difference observed between cases and controls is related to sex and this effect was observed in man, but not in women. In our study we found that depressed patients who have at least one copy of allele G were more prone to attempt suicide as compared to depressed patients without the G allele.

Key Words 5-HT_{1A} receptor, suicide attempt, major depression, -1019 C/G polymorphism, SNP

Introduction

For the past 20 years, there has been increasing evidence that suicidal behavior is related to a neurobiological factor. It has been shown that protein and receptors in serotonergic pathway may play an important role in suicidal behavior (Mann, 1998).

The 5-HT_{1A} receptors, which are present in many brain regions, mediate serotonin, in the pre and post-synaptic neurons (Barnes and Sharp, 1999; Drago A. et al., 2007). A single Nucleotide Polymorphism (SNP) located in the promoter region of 5-HT_{1A} receptor gene (Kobilka et al., 1987), denominated rs6295 (-1019 C>G) (Wu and Comings, 1999), could be responsible for the receptor genetic expression regulation in humans (Lemondé et al., 2003; Czeak et al. 2006). The SNP works as a link, in the receptor gene, into a transcription NUDR factor (nuclear DEAF-1 related protein), and it has been identified as a DNA linking protein and a potential regulator gene (Huggenvik et al., 1998). When present, the C allele functions as a link to the NUDR and represses the transcription activity of 5-HT_{1A} receptor gene. The G allele loses its role as a link and drives the receptor into an abnormal activity; therefore it leads to a neurotransmitter modification in the synaptic cleft. (Lemondé et al., 2003; Albert and Lemondé, 2004; François et al. 2008; Savitz J., et al., 2009). Even though the mechanisms that define NUDR (Deaf-1) activity are not clear, its expression is thought to be related to the G allele presence (François et al., 2008). Savitz et al. (2009) showed that the G allele of the rs6295 5-HT_{1A} polymorphism has been postulated to up-regulate autoreceptor expression in the raphe, but decrease expression of the postsynaptic 5-HT_{1A} receptor; perhaps explaining why the G variant is over-represented in some major depressive disorder (MDD) samples.

Several studies on the 5-HT_{1A} receptor have tried to associate the polymorphism (-1019 C>G) with depression and suicidal behavior with controversial results. Lemondé et al. (2003) suggest a novel transcriptional model in which the G allele depresses 5-HT_{1A} autoreceptor expression reducing serotonergic neurotransmission, predisposing to depression and suicide when comparing 102 suicide completers with 116 normal controls. This data is similar to Lenze et al (2008) study in which the G allele of the 5-HT_{1A} (-1019 C>G) polymorphism was associated with increased depressive symptoms. Parsey et al (2006) in a positron emission tomography (PET) analysis study, observed that the genotype G/G was related to

depression in a sample of medication free depressive patients when compared to a control-group. In contrast Wu et al. (2008) suggested that 5-HT_{1A} (-1019 C/G) polymorphism is probably associated with MDD and it is likely to be a susceptible gene locus for females and late-onset MDD, however, in this study, the G/G genotype, contradicting most studies, was the less probable one to be associated with the disorder. In addition, there are some studies showing no association between MDD and 5HT_{1A} (Pitchot et al. 2005; Serretti et al.2007), suggesting that the HTR_{1A} gene may not play a major role in the genetic susceptibility underlying depressive and anxiety-related phenotypes (Hettema et al. 2008).

Since available results are controversial and there are no studies investigating this association in patients with the genetic background of Brazil, the aim of this study was to verify the possible influence of rs6295 (-1019 C/G) polymorphism in depressive patients, from south of Brazil who attempted suicide, and compare them to a control-group.

Materials and Methods

This is a case-control study where subjects were cautiously paired (1:1) by sex and age (maximum acceptable difference of 2 years). Cases and controls were at least eighteen years old and of caucasian origin. The case population studied (n=87) consisted of patients admitted to the Emergency Hospital of Porto Alegre (Hospital de Pronto Socorro - HPS) for serious suicide attempts and requirement of medical care either at the emergency ward or at the intensive care unit due to a life-threatening condition and fulfill DSM-IV diagnostic criteria for Major Depressive Disorder (MDD). The control group (n=87) was a convenience sample composed by employees of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) without psychiatric disorders, recruited between June 2006 and April 2007.

Cases and controls were evaluated by a Psychiatric Interview and the Mini International Neuropsychiatry Interview (MINI) - Brazilian version (Sheehan et al., 1998). A semi-structured interview was used to access sociodemographic data and clinical history. The Beck's Suicidal Intention Scale (SIS) was used in the interviewed patients by the psychiatrist, including 15 items, each scored 0 to 2 (Beck et al., 1974)

Blood was collected from both control and patients groups for DNA extraction after informed consent. This study was conducted in accordance with the Declaration

of Helsinki. Institutional review board approval was obtained from the ethics committee of HCPA (Numbers 04-272 and 05-613).

PCR analysis

Allele-specific polymerase chain reaction (PCR) amplification analysis was adapted from (Parsey R. et al., 2006) and performed in 12,5 µl of reaction mixture containing 1X PCR buffer (Invitrogen), (100) ng DNA, 1.6 mM MgCl₂ (Invitrogen), 0,8% of Q-solution, 0.2mM of dNTP, 0.75U Taq polymerase (Invitrogen), 5pm of each primer. Each sample was amplified using the following primers: 5'-CTGAGGGAGTAAGGCTGGAC-3' = (A) and 5'-GAAGAC CGAGTGTG TCTTCG-3' = (B) primer set specific for the "G" allele or the 5'-CTGA GGGAGTAAGGCTGGAC-3' = (A) and 5'-GAAGACCGAGTGTGTCTTCC-3'=(C) primer set specific for the "C" allele (Wu and Comings 1999).

The reaction conditions were as follows: 94°C for 5 min, 40 cycles at 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 30 s and a final extension step at 72°C for 5 min. The PCR amplifications were performed whit the Programmable Thermal Controller - PTC-100 (MJ Research, INC). The electrophoresis was performed in 1.5% agarose gel and the amplification products were visualized with UV light.

Statistical Analysis

Data are presented as mean ± standard deviation, count and percentage (%). Allelic and genotypic tests were performed, using Chi-square test with and without continuity Yates correction. Additionally, we perform an exploratory analysis through stratified analysis using the following variables: gender, presence/absence of comorbidities; use/non-use of alcohol during the suicide attempt and violent/non-violent suicide attempt using the same tests described above. One-way ANOVAs were used to compare the SIS scores between the different groups of patients according to genotype in the two classifications.

Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium were conducted with the χ^2 test for goodness of fit. Statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 14.0 (SPSS for Windows 14.0, SPSS, Chicago, IL, USA) and Programs for Epidemiologists PEPI v. 4.0 for DOS. The level of significance used was $\alpha=0.05$. Regarding allelic test of the primary

analysis, an estimated power of 80% and a minor allele frequency of 0.43 we were able to detect odd ratio higher than 2.5.

Results

The final sample was composed by 174 individuals. Of those, 110 (63.2%) were women, with an average age of 34.9 ± 10.50 with no differences between cases and controls (34.5 ± 10.82 vs. 35.2 ± 10.21 , respectively; $t = -0.018$, $p = 0.677$). There were no significant differences between cases and controls regarding marital status, employment status and educational level ($p > 0.05$; data not show). Suicide attempts were classified as violent ($n = 38$; 43.7%) or non-violent ($n = 49$; 56.3%). Regarding comorbidity, 18 (20.7%) met criteria for alcohol dependence, 12 (6.9%) for alcohol and drug dependence.

The frequency of the ancestry allele of rs6295 (-1019 C>G) of 5-HTR_{1A} in the whole sample was $C = 0.51$, with no significant deviation from Hardy Weinberg Equilibrium ($\chi^2 = 0.07$, $df = 1$, $p = 0.793$) in control sample. The difference in frequency of risk allele (G) between cases and controls 0.57 vs. 0.46 respectively, approached significance (OR=1.55; CI95% 1.02 to 2.37; $\chi^2_{\text{Yates}} = 3.727$, $df = 1$, $p = 0.054$). Additionally, genotypic test comparing differences between frequency of genotypes in cases [CC=13(14.9%), CG=49(56.3%), GG=25(28.7%)] and controls [CC=26(29.9%), CG=42(48.3%), GG=19(21.8%)] approached significance ($\chi^2 = 5.690$, $df = 2$, $p = 0.058$). There are significant differences if we consider having at least one copy of G allele (CG+GG vs. CC) in the dominant model, OR=2.43 (CI95% 1.15 to 5.12, $\chi^2_{\text{Yates}} = 4.759$, $df = 1$, $p = 0.029$).

In addition we explored our analysis aiming to evaluate whether the difference observed between cases and controls is related to sex. This effect was observed in man, with a high OR if we consider dominant model (OR=5.8; CI95% 1.45 to 23.23; $\chi^2_{\text{Yates}} = 5.573$, $df = 1$, $p = 0.007$) but not in women (OR=1.54; CI95% 0.62 to 3.84; $\chi^2_{\text{Yates}} = 0.480$, $df = 1$, $p = 0.489$). Allelic test and genotypic tests in the restricted sample of man approached and reached significance (respectively - $p = 0.051$ and $p = 0.029$) and there were no differences in these tests in the restricted sample of women. Further exploratory analysis regarding presence/absence of comorbidities; use/non-use of alcohol during the suicide attempt and violent/non-violent suicide attempt and analysis of SIS scores did not show significant results in allelic or genotypic tests.

Discussion

In our study we found that depressed patients who have at least one copy of allele G (CG + GG vs CC) were more prone to attempt suicide as compared to depressed patients without the G allele. Allelic tests and genotypic tests approached significance in showing this association. Additionally, we found a differential effect of the influence of G allele in suicide attempt according to gender, whereas there is a significant association of G allele and suicide attempt in the male sample, but not in female sample. Exploratory analysis failed to show additional significant results. This result is in accordance to the one reported by Lemonde et al. (2003) with a 4 times increased frequency of the GG genotype in 102 suicide victims compared to 116 control-group.

Based on our results, we corroborate the hypothesis that the G allele presence can influence serotonergic activity in men, by decreasing 5HT_{1A} transcription due to NUDR increased activity in post-synaptic regions. Thus, G allele becomes a susceptible factor in the male group, adding to the biological, environmental and behavioral (depressive disorder) conditions, and it can result in a major vulnerability into suicidal attempts. In the Szewczyk et al., (2008) study, the concentration of NUDR and 5-HT_{1A} receptor protein was significantly decreased in the prefrontal cortex (PFC) in female subjects with MDD relative to matched female controls, but was unchanged in the PFC of male depressed subjects compared to male controls. Regarding the (-1019 C>G) polymorphism in the present study, the male cohort of depressed suicide attempters also showed a trend for association with the G allele and depression. The finding that the female subjects did not display an association with the G allele is important, because it implies that the decrease in 5-HT_{1A} receptors observed in these subjects is not explained by impaired repression by NUDR at the G allele. In addition, the gender-specific alterations in cortical NUDR and 5-HT_{1A} receptor proteins could represent an underlying biological mechanism associated with the higher incidence of depression in women. These contradictory results may be explained by the hypothesis in which the polymorphism can act in different forms in the pre and post-synaptic receptors Czesak et al., (2006). Based on this hypothesis, the polymorphism acts as a transcriptional repressor of the 5-HT_{1A} receptor in serotonergic cells, but functions as a transcriptional enhancer of the 5-HT_{1A} receptor in nonserotonergic cells such as post-synaptic neurons. Therefore,

depending on the synaptic localization of 5-HT_{1A} receptors, NUDR may serve distinct functional roles.

Many studies support the hypothesis of G allele in polymorphism (-1019 C>G) as one of the modifying factors of the serotonergic function system. Parsey et al., (2006) found in “antidepressants naive (AN)” an increasing of the 5-HT_{1A} receptors expression compared to antidepressants exposure (AE) and control-groups, suggesting a model of depression characterized by an over expression of auto inhibitory somatodendritic 5-HT_{1A} receptors, perhaps due to the G allele presence, that may result in reduced terminal field 5-HT release. AE appears to have long-term effects on 5-HT_{1A}. The results found by Hsiung et al., (2003) suggest that the alterations in agonist-stimulated 5-HT_{1A} receptor activation in depressed suicide victims are also manifested downstream from the associated G protein, affecting the activity of second messengers in two 5-HT_{1A} receptor transduction pathways that may have implications for cell survival. In 2007, Sawiniec et. Al (2007), analyzed the allelic and genotypic frequency among 65 patients, who attempted suicide and 63 control-group controlled for psychiatry disorders and found a higher frequency of allele G in the suicidal patients. Besides, the genotypic frequency was significantly different between the control-group and hospitalized patients. This study data confirms the hypothesis that the polymorphism (-1019 C>G) of receptor 5-HT_{1A} increases the risk of suicide attempt. Benko et al., (2009) studied the relationship between impulsivity and the (-1019 C>G) polymorphism of the 5-HT_{1A} in a population sample of 725 volunteers. Subjects carrying GG genotype showed significantly higher impulsiveness scores compared to GC or CC carriers. The result suggest the involvement of the 5-HT_{1A} in the continuum phenotype of impulsivity. An interesting study made by Zhang et al., (2009), who studied the combined effect of receptor 5-HT_{1A} (-1019 C>G) with the serotonin 5-HTTLPR in Chinese patients with major depressive disorder, has confirmed this effect.

Our results should be interpreted in light of some limitations. The possibility of spurious association must be considered due to multiple testing regarding exploratory analysis. In order to avoid bias due to sample size, our sample is restricted to depressed patients diagnosed by DSM- V criteria, to patients admitted to an emergency hospital due to serious suicide attempt, to Caucasian population and did not include suicide completers. We tried to diminish ethnic stratification by

restricting our analyses to Caucasian subjects that are phenotypically recognized in the south of Brazil (Zembrzuski, 2006). The south Brazil region show the lowest rate of admixture due to the influences received by Portuguese, Italians, Germans and Spanish descendants.

In conclusion, this is the first study to demonstrate a significant association between suicide attempt in depressed patients and 5HT_{1A} polymorphisms in South America. Such studies need to be replicated in other populations with a larger sample size to provide a better understanding regarding 5-HT_{1A} receptor polymorphism (-1019 C>G), the roles of serotonin system and other genes involved in suicide attempt.

Acknowledgements

This study received institutional support funds from FIPE-HCPA. Rafael Rebelo e Silva is supported by a governmental (CAPES) M.Sc. Scholarship.

References

- Barnes, N.M., Sharp, T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 1999; 38: 1083-1152.
- Beck A.T., Shuyler D., Herman I. Development of suicidal intent scales, in: A.T. Beck (Ed.), *The Prediction of Suicide*, Charles Press, Philadelphia, PA. 1974; pp. 45–56.
- Benko A, Lazary J, Molnar E, Gonda X, Tothfalusi L, Pap D, Mirnics Z, Kurimay T, Chase D, Juhasz G, Anderson IM, Deakin JF, Bagdy G. Significant association between the C(-1019)G functional polymorphism of the HTR(1A) gene and impulsivity. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 2009; 153: 592-599.
- Czesak, M., Lemonde, S., Peterson, E.A., Rogaeva, A., Albert, P.R. Cell-specific repressor or enhancer activities of Deaf-1 at a serotonin 1A receptor gene polymorphism. *Journal of Neuroscience*. 2006; 26: 1864-1871.
- Drago, A., De Ronchi, D., Serretti, A. 5-HT1A gene variants and psychiatric disorders a review of current literature and selection of SNPs for future studies. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2008; 11: 701-721.
- Hettema, J.M., An, S.S., van den Oord, E., Neale, M.C., Kendler, K.S., Chen, X. Association study between the serotonin 1A receptor (HTR1A) gene and neuroticism, major depression, and anxiety disorders. *American Journal of Medical Genetics Part B-Neuropsychiatric Genetics*. 2008; 147B: 661-666.
- Hsiung, S., Adlersberg, M., Arango, V., Mann, J.J., Tamir, H., Liu, K.P. Attenuated 5-HT1A receptor signaling in brains of suicide victims: involvement of adenylyl cyclase, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt and mitogen-activated protein kinase. *Journal of Neurochemistry*, 2003; 87: 182-194.
- Huggenvik, J.I., Michelson, R.J., Collard, M.W., Ziemba, A.J., Gurley, P., Mowen, K.A. Characterization of a nuclear deformed epidermal autoregulatory factor-1 (DEAF-1)-related (NUDR) transcriptional regulator protein. *Molecular Endocrinology*. 1998; 12: 1619-1639.
- Kobilka, B.K., Frielle, T., Collins, S., Yangfeng, T., Kobilka, T.S., Francke, U., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine-nucleotide regulatory proteins. *Nature*. 1987; 329: 75-79.
- Le Francois, B., Czesak, M., Steubl, D., Albert, P.R. Transcriptional regulation at a HTR1A polymorphism associated with mental illness. *Neuropharmacology*. 2008; 55: 977-985.
- Lemonde, S., Du, L.S., Bakish, D., Hrdina, P., Albert, P.R. Association of the C(-1019)G 5-HT1A functional promoter polymorphism with antidepressant response. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2004; 7: 501-506.

Lemonde, S., Turecki, G., Bakish, D., Du, L.S., Hrdina, P.D., Bown, C.D., Sequeira, A., Kushwaha, N., Morris, S.J., Basak, A., Ou, X.M., Albert, P.R. Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide. *Journal of Neuroscience*. 2003; 23: 8788-8799.

Lenze, E.J., Shardell, M., Ferrell, R.E., Orwig, D., Yu-Yahiro, J., Hawkes, W., Fredman, L., Miller, R., Magaziner, J. Association of serotonin-1A and 2A receptor promoter polymorphisms with depressive symptoms and functional recovery in elderly persons after hip fracture. *Journal of Affective Disorders*. 2008; 111: 61-66.

Mann, J.J. The neurobiology of suicide. *Nature Medicine*. 1998; 4: 25-30.

Parsey, R.V., Oquendo, M.A., Ogden, R.T., Olvet, D.M., Simpson, N., Huang, Y.Y., Van Heertum, R.L., Arango, V., Mann, J.J. Altered serotonin 1A binding in major depression: A carbonyl-C-11 WAY100635 positron emission tomography study. *Biological Psychiatry*. 2006b; 59: 106-113.

Pitchot, W., Hansenne, M., Pinto, E., Reggers, J., Fuchs, S., Anseau, M. 5-hydroxytryptamine 1A receptors, major depression, and suicidal behavior. *Biological Psychiatry*. 2005b; 58: 854-858.

Savitz, J., Lucki, I., Drevets, W.C. 5-HT1A receptor function in major depressive disorder. *Progress in Neurobiology*. 2009; 88: 17-31.

Sawiniec J, Borkowski K, Ginalska G, Lewandowska-Stanek H. Association between 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism and suicidal behavior. *Przegl Lek*. 2007; 64(4-5): 208-11.

Serretti, A., Mandelli, L., Giegling, I., Schneider, B., Hartmann, A.M., Schnabel, A., Maurer, K., Moller, H.J., Rujescu, D. HTR2C and HTR1A gene variants in German and Italian suicide attempters and completers. *American Journal of Medical Genetics Part B-Neuropsychiatric Genetics*. 2007; 144B: 291-299.

Sheehan, D.V., Lecrubier, Y., Sheehan, K.H., Amorim, P., Janavs, J., Weiller, E., Hergueta, T., Baker, R., Dunbar, G.C. The Mini-International Neuropsychiatric Interview (MINI): The development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10. *Journal of Clinical Psychiatry*. 1998; 59: 22-33.

Szewczyk, B., Albert, P.R., Burns, A.M., Czesak, M., Overholser, J.C., Jurjus, G.J., Meltzer, H.Y., Konick, L.C., Dieter, L., Herbst, N., May, W., Rajkowska, G., Stockmeier, C.A., Austin, M.C. Gender-specific decrease in NUDR and 5-HT1A receptor proteins in the prefrontal cortex of subjects with major depressive disorder. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2009; 12: 155-168.

Wu, S., Comings, D.E. A common C-1018G polymorphism in the human 5-HT1A receptor gene. *Psychiatric Genetics*. 1999; 9: 105-106.

Wu, Y., Xu, Y., Sun, Y., Wang, Y.F., Li, X., Lang, X.E., Wang, W.P., Zhang, K.R. Association between the serotonin 1A receptor (C-1019)G polymorphism and major depressive disorder in the northern Han ethnic group in China. *Chinese Medical Journal*. 2008; 121: 874-876.

Zembrzuski, V.M., Callegari-Jacques, S.M., Hutz, M.H. Application of an African ancestry index as a genomic control approach in a Brazilian population. *Annals of Human Genetics*. 2006; 70: 822-828.

Zhang, K.R., Xu, Q., Xu, Y., Yang, H., Luo, J.X., Sun, Y., Sun, N., Wang, S., Shen, Y. 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*. 2009; 114: 224-231.

Considerações Finais

A compreensão dos fatores genéticos que contribuem para a vulnerabilidade ao comportamento suicida ainda está longe de ser totalmente elucidada. Apesar dos resultados controversos da literatura, em nosso estudo, os pacientes depressivos com tentativa de suicídio e com pelo menos uma cópia do alelo polimórfico G (CG + GG vs CC) para o polimorfismo (-1019C>G) do receptor de serotonina 5-HT_{1A} (rs6295), apresentaram maior suscetibilidade à tentativa de suicídio do que os pacientes que não apresentaram o alelo G, conforme indicou o teste alélico e genotípico (CI95% 1.15 to 5.12, $\chi^2_{\text{Yates}}=4.759$, df=1, p=0.029). Esses resultados corroboram à hipótese de que o alelo G(-1019) possa estar exercendo certa influencia, junto com outros fatores, para o desenvolvimento de algum transtorno psiquiátrico (Huang *et al.*, 2004; Savitz *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009).

Além disso, foi encontrado um efeito diferencial da influencia do alelo G na tentativa de suicídio em relação ao gênero. Sabe-se que o comportamento suicida difere entre homens e mulheres. Embora as mulheres façam mais tentativas de suicídio que os homens, estes tem uma mortalidade 4 vezes maior que as mulheres em suas tentativas. Em 80% dos suicídios concretizados relaciona-se ao sexo masculino (Roy, 1999). Na amostra deste estudo, a influencia do alelo G(-1019) do receptor 5-HT_{1A} na tentativa de suicídio se mostrou diferente quando comparados entre homens e mulheres. Esse efeito foi associado com a amostra masculina (OR=5.8; CI95% 1.45 to 23.23; $\chi^2_{\text{Yates}}=5.573$, df=1, p=0.007) e não com a feminina (OR=1.54; CI95% 0.62 to 3.84; $\chi^2_{\text{Yates}}=0.480$, df=1, p=0.489). O resultado foi similar ao encontrado por Lemonde *et al.* (2003) em seu estudo, aonde observou nos homens que o genótipo GG foi mais frequente nos indivíduos que cometeram suicídio em relação aos controles.

Acredita-se que alterações polimórficas no gene do receptor 5-HT_{2A} estão associadas a várias doenças neuropsiquiátricas (Zhang *et al.*, 1997; Du *et al.*, 2000; Keltikangas-Järvinen *et al.*, 2008; Vaquero-Lorenzo *et al.*, 2008). Na análise do polimorfismo T102C dos receptores 5-HT_{2A} (rs6313) (anexo I), realizada nesse estudo, uma diferença significativa foi encontrada para o genótipo CC entre pacientes e controles. A frequência encontrada do genótipo CC foi maior no grupo

controle do que nos pacientes ($X^2= 6,179$, $df= 2$, $P= 0,046$). Quando realizado o teste sobre o efeito do alelo dominante, ou seja, testar o efeito da presença de pelo menos uma cópia do alelo, os resultados obtidos não foram significativos ($OR=0.679$; $CI95\%$ 0.372 to 1.239; $\chi^2 =1.603$, $df=1$, $p=0.132$). A mesma análise utilizada em pacientes e controles foi aplicada para verificar o efeito do polimorfismo no gênero. Os resultados não apresentaram significância para a frequência dos genótipos e no modelo dominante, respectivamente ($P=0,224$ e $P=0,183$). Esses dados contrariam o estudo de Du *et al.*, (2000), que encontrou significância entre o alelo C em pacientes com transtorno depressivo maior com ideação suicida. Entretanto, Khait e colegas (2005) não encontrou associação entre o polimorfismo T102C do receptor de serotonina e transtornos de humor e suicídio.

O polimorfismo T102C dos receptores 5-HT_{2A} não resulta em alteração na sequência de aminoácidos da proteína, portanto, pode-se considerar que não ocorrem danos estruturais e fisiológicos nos receptores 5-HT_{2A} e em sua cascata sinalizadora. Porém, a importância desse polimorfismo se dá pela associação do polimorfismo T102C com depressão maior e esquizofrenia encontrada por Pata, *et al.*, (2004). Além disso, o subtipo 5-HT_{2A} é o mais importante funcionalmente, pois participa dos efeitos fisiológicos mediados pelo receptor no SNC, além de ter uma importante função na excitação neuronal, efeitos no comportamento, aprendizagem e ansiedade. O 5-HT_{2A} apresentou importância inicial por ser alvo de drogas psicodélicas (LSD) e voltou a ser proeminente por mediar, em parte, a ação de anti-psicóticos, principalmente atípicos. Na amostra, pode-se supor que o polimorfismo T102C (rs6313) não teve grande efeito no desenvolvimento do comportamento suicida. Mesmo que para os receptores 5-HT_{2A} os resultados não tenham sido significativos, sabe-se das limitações do tamanho amostral e da origem étnica da população brasileira. No entanto, houve a tentativa de diminuir a estratificação étnica, restringindo a análise aos pacientes caucasianos que são fenotipicamente reconhecidos no sul do Brasil, uma vez que a região sul do Brasil apresenta uma das menores taxas de mistura étnica devido às influências recebidas por descendentes Portugueses, Italianos, Alemães e Espanhóis (Zembruski *et al.*, 2006).

Baseado nos resultados pode-se corroborar a hipótese de que, para os receptores 5-HT_{1A}, a presença do alelo G pode influenciar a atividade serotoninérgica nos homens, pela diminuição da transcrição dos receptores 5-HT_{1A}. Assim, o alelo G torna-se um possível fator de suscetibilidade para o sexo masculino, somando as condições biológicas, ambientais e comportamentais, podendo resultar em uma maior vulnerabilidade ao comportamento suicida. Para os receptores 5-HT_{2A}, os resultados não foram significativos, indicando que o alelo polimórfico C não oferece suscetibilidade para essa amostra de pacientes depressivos com tentativa de suicídio. Sabe-se que os estudos de caso-controle são ideais em casos de doenças ou desfechos raros, pois selecionam os indivíduos a partir do desfecho e descreve uma exposição anterior, nesse caso, os genótipos e alelos. Apesar de os resultados serem positivos, os estudos de associação devem ser replicados em outras populações e com amostras maiores, aumentando o poder do estudo para um melhor entendimento do efeito genético sobre os transtornos comportamentais. Além disso, não se pode descartar que outros fatores possam estar segregando nesta amostra juntamente com os genótipos. Os fatores ambientais são importantes para o desenvolvimento das características comportamentais e, nesse tipo de estudo, o histórico pessoal pode ser determinante para o desenvolvimento dos transtornos depressivos, assim como o comportamento suicida.

O comportamento suicida tem sido foco de atenção de diversos pesquisadores no mundo inteiro devido a sua impressionante frequência. Mesmo já havendo definições sobre os fatores de risco e proteção do suicídio, estes ainda constituem-se insuficientes na prevenção e no tratamento do problema. Ainda há muito para se esclarecer sobre a compreensão dos efeitos genéticos na vulnerabilidade para o comportamento suicida. Os avanços científicos têm proporcionado meios para o desenvolvimento de estudos que tentam relacionar a genética com os transtornos psiquiátricos. Estudos de interação gene - ambiente, gene-gene-ambiente, análise de famílias, trios e de haplótipos de suscetibilidade que relacionam polimorfismos de diferentes sistemas, tem apresentado resultados bastante promissores na busca de encontrar o entendimento dos transtornos comportamentais. Pesquisas sobre epigenética estão sendo utilizadas na busca por respostas sobre o poder do efeito ambiental sobre os genes. Sabe-se que os indivíduos nascem com o material

genético necessário para expressar todas as proteínas do organismo, porém a carga genética de um indivíduo pode estar sujeita às ações ambientais em aspectos relacionados ao desenvolvimento do indivíduo e de doenças. Estudos envolvendo mecanismos genéticos via metilação podem influenciar o funcionamento de genes atenuando ou silenciando sua expressão.

Não é possível prever com certeza através da análise do genótipo de um indivíduo se ele um dia cometerá ou não suicídio. Sabe-se que os transtornos comportamentais, assim como o comportamento suicida, são multideterminados, ou seja, a ação de diversos fatores complexos que envolvem o histórico de vida de um indivíduo é que podem determinar esse tipo de comportamento. Sendo assim, o aperfeiçoamento de ferramentas diagnósticas é essencial para desenvolver programas e estratégias de ação, aprimorando a qualidade do atendimento para as populações de risco.

APÊNDICE A – Dados não submetidos a publicação

Análise do polimorfismo rs6313 do receptor de serotonina 5-HT_{2A}

MATERIAL E MÉTODO

O trabalho foi desenvolvido utilizando-se um banco de DNA pré-existente. Este material consta de DNA extraído de sangue periférico proveniente de 132 pacientes deprimidos internados no Hospital de Pronto Socorro por tentativa de suicídio seja por ingestão de substâncias e/ou métodos que envolvam conduta autoagressiva (ferimentos autoinfligidos por arma branca ou de fogo, enforcamento ou outros meios). Na ocasião da coleta de dados, todos os pacientes concordaram em participar do estudo através de termo de consentimento informado, assinado pelo participante (Anexo 1). Os participantes estão cadastrados em um arquivo com nome, número e informações epidemiológicas que se encontra em poder do médico responsável por contatar os mesmos para informar os resultados globais obtidos na pesquisa. Para a população controle, foi utilizado um banco genético de indivíduos sem diagnóstico psiquiátrico em Eixo I, que foram selecionados entre funcionários do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os sujeitos foram inicialmente avaliados por uma entrevista clínica por um psiquiatra clínico e através do MINI, uma entrevista psiquiátrica estruturada que abrange os principais diagnósticos segundo os critérios do DSM-IV. Considerando-se o número total de funcionários do HCPA como 4500 sujeitos, a prevalência mínima para os marcadores de 17%, um alfa de 5% e beta de 99%, o tamanho mínimo calculado da amostra foi de 52 sujeitos. Nosso banco está composto de 152 indivíduos.

Investigação Molecular

Foram utilizadas amostras de DNA genômico, previamente extraídas a partir de 5ml de sangue total coletado através de punção venosa periférica, conforme o método de precipitação de sais descrito por Miller *et al.*, (1988), armazenadas em um banco de DNA numerado e identificado. Estas amostras de DNA encontram-se armazenadas em freezer a uma temperatura de -20⁰C no Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Genética Médica do HCPA.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A região polimórfica do exon 1 do gene 5-HT_{2A} foi amplificada através do método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando-se os primers 5-HT_{2A} 5' - TCGCTACAAGTTCTGGCTT - 3' (forward) e 5-HT_{2A} 5' - CTGCAGTTTTTCTCTAGGG - 3' (reversed) descritos por Warren et al.,(1993). A análise deste polimorfismo foi realizada através da técnica de *restriction fragment lenght polymorphism* (RFLP). A partir da obtenção de um produto amplificado foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1,5% para a verificação da presença de quantidade suficiente do produto de PCR, através de uma banda de 342 pb. A seguir, 10µL do produto de PCR foi submetido a uma reação de digestão, utilizando 1,5µL da enzima de restrição *MspI*, a 37°C overnight. O produto da digestão foi visualizado em gel de agarose 3%. A presença de um fragmento de 342 pb indica a presença do alelo T (sem a transversão), e a presença de dois fragmentos, um de 215 pb e outro de 126 pb indicam a presença do alelo C com a transversão (Ogilvie et al., 1998 apud Pata et al., 2004).

Planejamento da Análise dos Dados

O delineamento da pesquisa foi do tipo caso-controle, e para a análise estatística utilizou-se o Pacote estatístico SPSS para Windows versão 11, com a finalidade de se realizar uma análise multivariada a partir dos dados obtidos nos pacientes e controles.

Anexo 1

Termo de Consentimento Informado

Projeto de Pesquisa: “Estudo dos haplótipos de suscetibilidade ao comportamento suicida em pacientes deprimidos que tentaram o suicídio”

Este projeto de pesquisa tem como objetivo estudar os pacientes que procuraram atendimento no Hospital de Pronto Socorro devido a uma tentativa de suicídio. Durante o atendimento se buscará obter informações sobre os possíveis motivos e causas que possam ter levado a tentativa de suicídio e assim buscar o tratamento adequado para cada situação. Os pacientes que buscam o HPS serão convidados a participar de um estudo sobre o suicídio que envolve a avaliação genética. Essa avaliação será feita a partir da coleta de 10 ml de sangue dos pacientes que aceitarem participar deste projeto. A razão de se estudar o sangue dos pacientes é que se sabe que há uma possível relação genética com condutas autodestrutivas, incluindo o suicídio e a impulsividade. Assim através da análise de sangue se investigará a presença de um fator que pode estar relacionado com o desenvolvimento da doença depressiva e com o suicídio.

Risco e Desconforto

Os riscos associados à coleta de sangue são mínimos, podendo ocorrer manchas roxas e dor no local da coleta. O desconforto será mínimo, pois a coleta será realizada por profissional treinado e experiente.

Benefícios

O presente estudo não se propõe a trazer benefícios diretos e imediatos aos pacientes investigados. Mas o estudo pode contribuir para uma melhor compreensão a respeito do suicídio, que no futuro, leve a uma melhor definição do diagnóstico, do tratamento e do prognóstico dos pacientes e ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais efetivas para esta situação.

Recusa ou Descontinuação da participação

Eu entendo que a participação neste estudo é voluntária e que posso, a qualquer momento, retirar meu consentimento e interromper minha participação. A recusa em participar ou a desistência não ocasionará nenhum prejuízo aos cuidados médicos que estou recebendo nem está condicionado a continuidade do tratamento que recebo no Hospital de Pronto Socorro.

Pelo presente termo, declaro que fui informado, de forma clara e detalhada, sobre o presente projeto de pesquisa, e que tive minhas dúvidas esclarecidas por_____. Fui igualmente informado sobre a garantia da manutenção do anonimato, da privacidade das informações que forneci e também recebi respostas e esclarecimentos sobre todos os procedimentos envolvidos nesta pesquisa. Declaro também que estou de pleno acordo com a minha participação neste projeto.

Nome do participante ou responsável

Assinatura do participante ou responsável

Responsabilidade do pesquisador

Eu expliquei a _____ o objetivo deste estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e benefícios, usando o meu melhor conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável e cumprir com aquilo que foi informado ao paciente.

Nome do pesquisador ou associado

Assinatura do pesquisador

Porto Alegre, _____ de _____ de 200__.

Contato: Dr. Jair Segal, psiquiatra do HPS (Fone: 32897999).