

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS -
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
NEUROCIÊNCIAS**

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE OS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE E
SEUS ENDOFENÓTIPOS E O POLIMORFISMO DA REGIÃO PROMOTORA DO
GENE DO TRANSPORTADOR DE SEROTONINA (5-HTTLPR) EM
ADOLESCENTES**

Andressa Bortoluzzi

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Gisele Gus Manfro

Co-orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Sandra Leistner-Segal

Porto Alegre, maio de 2012.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS -
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
NEUROCIÊNCIAS**

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE OS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE E
SEUS ENDOFENÓTIPOS E O POLIMORFISMO DA REGIÃO PROMOTORA DO
GENE DO TRANSPORTADOR DE SEROTONINA (5-HTTLPR) EM
ADOLESCENTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Neurociências.

Andressa Bortoluzzi

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Gisele Gus Manfro

Co-orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Sandra Leistner-Segal

Porto Alegre, maio de 2012.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Gisele Gus Manfro, pela dedicação, parceria, confiança, disponibilidade, dinamismo e entusiasmo pela pesquisa. Agradeço pelo incentivo na busca de novos desafios e perseverança frente a qualquer adversidade.

À minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a Sandra Leistner-Segal, pelo convívio diário, pela dedicação, competência e incentivo, mesmo nos momentos difíceis.

À Carolina Blaya, pela condução das análises estatísticas desse trabalho, além da enorme contribuição intelectual nas discussões a respeito do tema da pesquisa.

Ao Giovanni Abrahão Salum pelo dinamismo, brilhantismo e contribuição em todas as etapas desse trabalho. Agradeço pela competência e produção intelectual.

À Eduarda Rosa que, mesmo entrando no final da prática desse trabalho, foi a minha companheira no laboratório e presença necessária nos demais trabalhos. Agradeço por ser essa Iniciação Científica tão positiva, dedicada e agradável.

Ao Prof. Marino Muxfeldt Bianchin, pela oportunidade de realização de estágio didático e pela confiança.

À Janaína e à Flávia, pelo apoio na escolha de fazer o mestrado em Neurociências.

Ao pessoal (atual e que já passou) do Laboratório de Genética Molecular do SGM/HCPA: Leise, Jéssica, Letícia, Taiana, Thaís, Roberto, Rafael, Ana Carolina, Fernanda, Fabiana e Laila (que foi a primeira a quem eu mostrei meus géis com as genotipagens). Em especial, às amigas Isabel, Francyne, Soraia, Ágata e Aline que tornaram os meus dias muito mais agradáveis e divertidos.

Ao Everaldo, pela disposição em ajudar nas questões burocráticas.

Ao grupo PROTAIA, pelo convívio e troca de experiências.

À Rudinéia Toazza, pelo conforto em momentos difíceis (apoio fundamental), incentivo e pelos momentos compartilhados na vida de mestranda em Neurociências. Também, agradeço pela bondade e amizade.

À Érica Maciel, pela consideração, amizade e apoio em fases complicadas. Agradeço por todas as palavras de incentivo e confiança.

À Camilinha, Ana Carolina, Gláucia, Angélica, Cintia e Suélen, por serem essas amigas fiéis e por estarem sempre dispostas a contribuir para os chamados “bons momentos da vida”.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida, viabilizando a conclusão dessa etapa acadêmica.

Aos participantes do estudo (adolescentes e suas famílias) e escolas, por contribuírem com a pesquisa do nosso país.

À minha família, pelo apoio em relação às minhas escolhas e suporte para alcançar os meus objetivos. Agradeço, também, pela compreensão em decisões importantes.

Ao Luigi (sobrinho amado), minha inspiração e fonte de entusiasmo, pela “mágica” de fazer com que um pensamento direcionado a ele seja motivo de felicidade.

Enfim, agradeço a todos que, de uma forma ou de outra, participaram dessa etapa de vida, incentivando o meu crescimento profissional e pessoal.

"Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer". (Amyr Klink)

RESUMO

Introdução: Os transtornos de ansiedade (TA) são prevalentes na infância e na adolescência e geram prejuízos significativos, podendo persistir na vida adulta. Os traços de personalidade e temperamento associados à ansiedade, como o comportamento inibido (CI) e a evitação de danos, também devem ser considerados. O neurotransmissor serotonina possui um papel crítico no desenvolvimento e na plasticidade do encéfalo. O gene do seu transportador (5-HTT) é um forte candidato para estudos de associação genéticos e psiquiátricos. O polimorfismo na região promotora do gene do 5-HTT (5-HTTLPR) é funcional e, portanto, de relevância para estudos de associação na psiquiatria.

Objetivos: Investigar a associação entre o 5-HTTLPR, através da sua classificação bialélica e trialélica, e os TA e fenótipos relacionados à ansiedade (CI e evitação de danos), em uma amostra de adolescentes ansiosos e não-ansiosos e seus familiares.

Metodologia: Um total de 510 indivíduos participou do estudo. Os participantes foram 225 adolescentes (129 casos e 96 controles para TA) e seus familiares biológicos (194 mães, 63 pais e 22 irmãos). Foi realizado o diagnóstico psiquiátrico através de entrevista clínica e do *Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children – Present and Lifetime Version Diagnostic Interview* (K-SADS-PL). A escala *Temperament and Character Inventory* (TCI) e uma adaptação da escala *Retrospective Self-report Scale of Behavioral Inhibition* foram usadas para mensurar a evitação de danos e o comportamento inibido, respectivamente. As análises moleculares resultaram da extração de DNA da amostra de saliva dos adolescentes e seus familiares, seguida de amplificação do DNA por PCR e digestão enzimática com enzima *MspI*. Os genótipos foram agrupados pelo nível de

expressividade: baixo (SS, L_GS, L_GL_G); intermediário (L_AL_G, L_AS) e alto (L_AL_A). A análise estatística foi realizada com o software PLINK e nível de significância $\alpha < 0.05$.

Resultados: Não foi encontrada associação entre o 5-HTTLPR, considerando a classificação bialélica e trialélica, e os transtornos de ansiedade, comportamento inibido e a evitação, tanto no caso-controle quanto no estudo de trios.

Conclusões: Nossos resultados não sugerem a presença de associação entre o 5-HTTLPR e os transtornos de ansiedade e seus fenótipos relacionados (comportamento inibido e evitação de danos) em adolescentes. Diante de resultados controversos descritos na literatura, estudos de meta-análises podem ser necessários para auxiliar no esclarecimento sobre essa questão.

Palavras-chave: Transtorno de Ansiedade; Traços de Ansiedade; 5-HTTLPR; Adolescência; Associação Genética

ABSTRACT

Introduction: Anxiety disorders (AD) are prevalent in childhood and adolescence and results in significant impairments. It usually persists into adulthood. Anxiety traits such as behavioral inhibition and harm avoidance may also be considered. The serotonin neurotransmitter plays an important role in the development and the plasticity of the brain. The serotonin transporter gene (5-HTT) is considered a strong candidate and the Serotonin Transporter Gene-linked Polymorphic Region (5-HTTLPR) functional and, therefore, relevant in studies concerning the association between genetic and psychiatric disorders.

Objectives: To investigate the association between 5-HTTLPR (biallelic and triallelic classification) and AD and anxiety related phenotypes (behavioral inhibition and harm avoidance) in a sample of adolescents and their families.

Methodology: A total of 510 subjects participated in this study. Participants were 225 adolescents (129 anxiety cases and 96 community controls) and their biological families (194 mothers, 66 fathers and 22 siblings). We assessed psychiatric diagnosis throughout a clinical interview and using the *Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children – Present and Lifetime Version Diagnostic Interview* (K-SADS-PL). The Temperament and Character Inventory (TCI) and an adaptation of the Resnick Behavioral Inhibition Scale were used in order to measure harm avoidance and behavioral inhibition, respectively. The molecular analysis resulted in the extraction of DNA from saliva sample of the adolescents and their families, followed by DNA amplification by PCR and enzymatic digestion with the MspI. The genotypes were grouped by level of expression: low (SS, L_GS, L_GL_G); intermediated (L_AL_G, L_AS) and high (L_AL_A). Statistical analysis was performed with the software PLINK, with the significance level of $\alpha < 0.05$.

Results: No association was found between 5-HTTLPR, considering the biallelic or triallelic analysis, and anxiety disorders, behavioral inhibition and harm avoidance in both case-control and trios studies.

Conclusion: Our results do not support a major role of 5-HTTLPR in anxiety disorders and anxiety-related phenotypes (behavioral inhibition and harm avoidance) in adolescents. In the face of mixed results, further investigations and meta-analytic studies are needed in order to clarify this research question.

Keywords: Anxiety disorders; Anxiety traits; 5-HTTLPR; Adolescence; Genetic association

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HIAA: ácido 5- hidroxindoleacético

5-HT: 5-hidroxitriptamina; serotonina

5-HT1: receptor 1 de serotonina

5-HT1A: subtipo A do receptor 1 de serotonina

5-HT1B: subtipo B de receptor 1 de serotonina

5-HT2: receptor 2 de serotonina

5-HT3: receptor 3 de serotonina

5-HTP: 5-hidroxitriptofano

5-HTT/ *SLC6A4*: transportador de serotonina

5-HTTLPR: polimorfismo da região promotora do gene transportador de serotonina

A: ambiente (quando referido às interações entre gene e ambiente)

ACC: córtex cingulado anterior

AMP_C: adenosina monofosfato cíclica

BDI-II: *Beck Depression Inventory score*

BDNF: *brain-derived neurotrophic factor* (fator neurotrófico derivado do encéfalo)

CBCL: *Child Behavior Checklist*

CI: comportamento inibido

COMT: catecol-o-metiltransferase

CTQ: *Childhood Trauma Questionnaire*

DNA: ácido desoxirribonucléico

DRD4: receptor D4 de dopamina

DSM-IV: 4ª edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

EPQ-R: *Eysenck Personality Questionnaire: revised*

FE: fobias específicas

FS: fobia social

G: gene (quando referido às interações entre gene e ambiente)

GPRP: receptor de peptídeo liberador de gastrina

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HHA: eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

IRMf: imagem por ressonância magnética funcional

Kb: quilobase

L: alelo longo do 5-HTTLPR

L_A: alelo longo (referência ao SNP rs25531)

L_G: alelo longo (referência ao SNP rs25531)

M.I.N.I: *Mini-International Neuropsychiatric Interview*

MAO: enzima monoamina oxidase

MAO-A: subtipo A da enzima monoamina oxidase

MAO-B: subtipo B da enzima monoamina oxidase

MMPI: *Minnesota Multiphasic Personality Inventory*

mPFC: córtex pré-frontal medial

MVA: modificação do viés atencional

NEO-FFI: *Neo Five-Factor Inventory*

OFC: córtex órbito-frontal

pb: pares de bases

PCR: reação em cadeia da polimerase

PROTAlA: Programa de transtornos de ansiedade na infância e adolescência

RGS2: regulador de sinalização 2 da proteína G

RNA_m: ácido ribonucléico mensageiro

S: alelo curto do 5-HTTLPR

SLC6A4: gene que codifica o transportador de serotonina

SNC: sistema nervoso central

SNP: *single nucleotide polymorphism* (polimorfismo de nucleotídeo único)

TA: transtorno de ansiedade

TAG: transtorno de ansiedade generalizada

TAS: transtorno de ansiedade de separação

TASocial: transtorno de ansiedade social

TCI: *Temperament and Character Inventory*

TDAH: transtorno de déficit de atenção e hiperatividade

TDT: teste de desequilíbrio de transmissão

TEPT: transtorno de estresse pós-traumático

TOC: transtorno obsessivo-compulsivo

TOD: transtorno desafiador opositor

TP: transtorno do pânico

TPH: enzima triptofano hidroxilase

TPH1: enzima triptofano hidroxilase tipo 1

TPH2: enzima triptofano hidroxilase tipo 2

UTR: região não-traduzida do gene

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Síntese de serotonina.....	26
Figura 2. Descrição da sinapse serotoninérgica e manipulação da 5-HT para a síntese, estocagem, liberação, recaptção e metabolismo.....	27
Figura 3. Esquema do movimento iônico realizado pelo 5-HTT.....	30
Figura 4. Representação esquemática do gene <i>SLC6A4</i> com os polimorfismos 5-HTTLPR, STin2VNTR e SNPs rs25531 e rs25532.....	32
Figura 5. Variação alélica funcional do 5-HTTLPR em função dos níveis de RNAm do 5-HTT.....	35
Figura 6. Comportamento da variante S do 5-HTTLPR dependendo da condição ambiental.....	41

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Transtornos de Ansiedade.....	15
1.2 Epidemiologia dos Transtornos de Ansiedade.....	20
1.3 Endofenótipos relacionados à Ansiedade.....	21
1.4 Serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT).....	23
1.5 Transportador de Serotonina (5-HTT; <i>SLC6A4</i>).....	28
1.6 Polimorfismo da Região Promotora do Gene do Transportador de Serotonina (5-HTTLPR).....	32
1.7 Transtornos de Ansiedade e seus Endofenótipos e o 5-HTTLPR.....	36
1.8 Efeitos Epistáticos (G x G) e interações Gene x Ambiente (G x A).....	45
2. JUSTIFICATIVA.....	50
3. OBJETIVOS.....	51
4. HIPÓTESES.....	52
5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	53
6. ARTIGO.....	54
7. DISCUSSÃO.....	74
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
ANEXO 1.....	94
ANEXO 2.....	95
ANEXO 3.....	97
ANEXO 4.....	98
ANEXO 5.....	100
ANEXO 6.....	101

1. INTRODUÇÃO

1.1 Transtornos de Ansiedade

A ansiedade é uma manifestação do organismo frente a algum tipo de perigo (real ou imaginário), sendo adaptativa na formação de respostas aos estímulos ameaçadores, a fim de promover segurança (PÉREZ-EDGAR; FOX, 2005; ROCKHILL et al., 2010). Em alguns casos, a gravidade, a frequência e/ou a persistência da ansiedade tornam-se inconsistentes com as circunstâncias apresentadas. Esse tipo de atitude leva a uma reação ansiosa que interfere negativamente no comportamento do indivíduo, tornando-se disfuncional e sendo caracterizada entre os denominados transtornos de ansiedade (TA).

Os TA não possuem um fenótipo único, mas vários subtipos de manifestações diferentes incluindo: (1) transtorno de ansiedade generalizada (TAG), (2) transtorno do pânico (TP), (3) transtorno de ansiedade de separação (TAS), (4) fobia social (FS) ou (5) transtorno de ansiedade social (TASocial), (6) transtorno obsessivo compulsivo (TOC) e (7) fobias específicas (FE) (LAU; PINE, 2008). Esses transtornos representam a forma mais prevalente de psicopatologia em crianças e adolescentes (ROCKHILL et al., 2010).

Apesar de suas características fenotípicas distintas, especialmente o foco do medo, estes transtornos costumam ser estudados como um grupo, com exceção do TOC e do transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), em função de sua etiologia comum e semelhança no tratamento (MARCH, 1995).

O traço de ansiedade, o estado de ansiedade e os TA diferem-se entre si pelo grau de prejuízo e duração dos sintomas de ansiedade no indivíduo. Estado de ansiedade é definido, normalmente, como uma medida de nível agudo ou

intermediário de ansiedade. Já o traço de ansiedade, ao contrário, é uma tendência, em longo tempo, de o indivíduo produzir uma resposta ansiosa aos eventos ambientais (PÉREZ-EDGAR; FOX, 2005).

Em especial, as crianças e os adolescentes exibem ansiedade, em nível aumentado, em algumas situações próprias do período do desenvolvimento (ex.: ansiedade de separação entre os 9 e 18 meses; medo de tempestades na primeira infância), tornando o diagnóstico de um possível TA um desafio para o avaliador (ROCKHILL et al., 2010). A ansiedade é marcada por um descontrole focado na possibilidade de uma futura ameaça, perigo ou outro evento potencialmente negativo (BARLOW et al., 1996).

Os TA são prevalentes na infância e na adolescência e estão associados com prejuízos acadêmicos, sociais e familiares. Além da enorme carga de sofrimento, os TA são relacionados a custos diretos e indiretos elevadíssimos para a economia e são considerados uns dos mais comuns e debilitantes transtornos psiquiátricos na vida adulta (PÉREZ-EDGAR et al., 2010).

As crianças, principalmente, por não possuírem muita habilidade para verbalizar suas angústias, podem ter seu quadro de ansiedade agravado. Os sintomas de ansiedade, em crianças, podem envolver manifestações físicas como dores de cabeça, dores de estômago e barriga, assim como evitação da escola ou mesmo birras quando confrontadas com situações desagradáveis (ROCKHILL et al., 2010). Nessa fase da vida, os indivíduos com TA podem apresentar comorbidades como depressão, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), transtorno desafiador opositor (TOD) ou transtornos de conduta (ROCKHILL et al., 2010).

Devido à dificuldade do diagnóstico e de tratamento “padrão-ouro” para os TA, poucos pais de crianças pré-escolares, por exemplo, com esses transtornos buscam atendimento para seus filhos. É muito difícil distinguir adequadamente os medos, as preocupações e a timidez em uma fase de vida considerada propícia para esse tipo de sensação e comportamento.

Muitos transtornos psiquiátricos observados na infância e na adolescência, incluindo àqueles envolvidos com ansiedade, podem ter continuidade heterotípica na vida adulta (COSTELLO et al., 2003). Isso significa que pode haver uma apresentação sintomática diferente do TA, dependendo da idade e de fatores ambientais específicos. Certos padrões de interação comportamental (conflitos familiares, dificuldades de relacionamento, demanda excessiva de responsabilidade, estresse dos pais) podem aumentar os sintomas ansiosos em crianças (PAHL et al., 2012). Muitos dos TA observados nos adultos possuem origem na infância e adolescência (KELLER et al., 1992, BEESDO et al., 2009). Nesse caso, investir em intervenções familiares logo cedo parece ser um importante foco de estudo com objetivo de diminuir morbidade.

Os TA são ditos “doenças complexas/ poligênicas” porque refletem a influência de vários ou muitos fatores de risco genéticos, cada um podendo ter pequenos efeitos individuais. Além disso, os genes de risco podem interagir, por exemplo, com outros genes (epistasia) ou com fatores ambientais (SMOLLER et al., 2009), contribuindo para a ocorrência de doenças complexas. Assim, estudos genéticos considerando múltiplas interações são úteis aos pesquisadores porque estimam o grau pelo qual os mesmos fatores genéticos influenciam duas ou mais variáveis (pleiotropia), bem como consideram as influências dos fatores ambientais na formação de um fenótipo múltiplo (JANG et al., 2001).

Problemas internalizantes (isolamento, queixas somáticas, sofrimento emocional) na infância são precursores frequentes para o desenvolvimento de síndromes psiquiátricas, incluindo TA e depressão (YOUNG et al., 2003). Estudos com gêmeos, sobre a etiologia desses transtornos, sugerem alta correlação para fatores de risco genético envolvendo ansiedade e depressão (KENDLER et al., 1992; HUDSON; RAPEE, 2002). Altos níveis de afetividade negativa têm sido ligados a aumentos dos níveis de problemas internalizantes, ansiedade e depressão (ROTHBART, 2004), enquanto que, simultaneamente, agem como um fator protetor contra o desenvolvimento de transtornos externalizantes (quebra de regras, comportamento agressivo e desafiador) (FRICK; MORRIS, 2004).

Uma meta-análise de estudos com famílias e gêmeos para investigação da contribuição genética para o transtorno do pânico (TP), transtorno de ansiedade generalizada (TAG), fobias e transtorno obsessivo compulsivo (TOC) sugeriu herdabilidade em torno de 30 a 40% para os TA, embora genes específicos possam conferir riscos maiores não identificados (HETTEMA et al., 2001). Em um trabalho de revisão sobre os TA na esfera molecular, Smoller et al. (2009) discorreram sobre a complexidade que envolve a definição fenotípica de um transtorno ansioso e todo o desafio de entendê-lo neurobiologicamente. Eles demonstraram, de maneira ampla, diversos desafios que acompanham as pesquisas em doenças complexas, como as comportamentais.

Muitos genes parecem contribuir para a ansiedade e a depressão, agindo por meio de diversos caminhos. A vulnerabilidade conferida por alguns genes pode ser especificamente alterada por eventos estressores ocorridos durante a vida da pessoa (KENDLER, 2005). A investigação de interações gene (G) X ambiente (A) pode ajudar a identificar os efeitos dos genes em comportamentos complexos e

doenças que permanecem com sua etiologia obscura (EVANS et al., 2009). A vulnerabilidade genética de um indivíduo para o desenvolvimento de TA pode resultar ou não de um estímulo ambiental (LAU; PINE, 2008).

Nos transtornos psiquiátricos, genes individuais aparecem com uma modesta associação para as doenças psiquiátricas. Uma razoável estratégia para estudos futuros seria avaliar a possível influência das interações entre diversos polimorfismos dentro do mesmo gene ou entre genes diferentes (CASPI et al., 2003). Há, também, situações em que o genótipo do indivíduo altera o efeito da exposição que um estressor ambiental provoca em relação ao desenvolvimento de transtornos mentais (POLANCZYK, 2009).

Há evidências de que irmãos de adolescentes ansiosos, embora livres de psicopatologias, também apresentem maiores níveis de emotividade e timidez quando comparados com irmãos de crianças em grupos controles. Isso sugere um compartilhamento genético que predispõe a criança à psicopatologia (MASI et al., 2003). O problema da “complexidade fenotípica” é um desafio que pode ser mais assustador para a genética psiquiátrica do que para outros campos da genética médica (SMOLLER et al., 2009).

Além disso, pesquisas translacionais podem ser interessantes na exploração da etiologia das doenças complexas. A reprodutibilidade de uma evidência encontrada em estudo animal e estudada em um modelo clínico é o exemplo clássico da importância desse tipo de abordagem em, por exemplo, TA (DONNER et al., 2008).

1.2 Epidemiologia dos Transtornos de Ansiedade

A prevalência estimada para os TA na comunidade varia com base nos diferentes métodos de pesquisa de informação, mas a frequência média é de 3,1% a 17,5% para o diagnóstico de qualquer TA, em crianças e adolescentes, conforme dados de múltiplos estudos epidemiológicos internacionais (ROCKHILL et al., 2010).

Usando os critérios da 4ª edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV), a estimativa dos TA em pré-escolares gira em torno de 9 a 10 % (EGGER; ANGOLD, 2006). No Brasil, um estudo realizado na cidade de Taubaté-SP, encontrou uma prevalência de 12,7% para transtornos psiquiátricos e 5,2% para qualquer transtorno de ansiedade em uma amostra de 1251 escolares. Eles encontraram, também, taxas de prevalência para cada transtorno específico: 1,4% para TAS; 1% para fobia específica; 0,7% para fobia social; 0,1% para TEPT; 0,1% para TOC; 0,4% para TAG e 2,1% para ansiedade não específica (FLEITLICH-BILYK; GOODMAN, 2004).

O risco de ter, no mínimo, qualquer transtorno psiquiátrico aos 16 anos é muito maior que algumas estimativas sugerem, sendo as comorbidades simultâneas e a continuidade do TA, de forma homotípica (continuidade do mesmo transtorno) ou heterotípica, mais prevalente em meninas (COSTELLO et al., 2003).

Filhos de pais com TA apresentam risco aumentado de desenvolver TA (HIRSHFELD-BECKER; BIEDERMAN, 2002). Alguns estudos sugerem que filhos de mães com TA são mais propensos a desenvolver algum TA quando comparados àqueles filhos de mães sem TA (HUDSON; RAPEE, 2002).

Entre crianças há um alto grau de comorbidade entre o TA e a depressão (aproximadamente 28%), sendo que a presença de comorbidade está associada a

sintomas mais graves de ansiedade (STRAUSS et al., 1988). O TA (ou a depressão) na adolescência prediz cerca de 2 a 3 vezes aumento no risco de ansiedade na vida adulta (PINE et al., 1998). É muito comum que a presença de algum TA possa preceder algum outro TA. Logo, a prevalência dos TA, combinados ao longo da vida, alcança uma média de 16,6% (SOMERS et al., 2006).

1.3 Endofenótipos relacionados à Ansiedade

Várias pesquisas têm estudado o papel dos endofenótipos ou fenótipos “intermediários” nos transtornos psiquiátricos. Endofenótipos representam “pistas”, de cunho hereditário, sobre o caráter genético de uma doença, podendo servir como um marcador biológico de risco para a manifestação da doença (GOTTESMAN; GOULD, 2003). São considerados endofenótipos os traços quantitativos relacionados à doença, incluindo medidas bioquímicas, endocrinológicas, fisiológicas e psicológicas, estudados em humanos. Esses endofenótipos podem interagir com outros fatores de vulnerabilidade, às vezes com diferenças no gênero e etnicidade, contribuindo para a ocorrência de transtornos específicos (SMOLLER et al., 2009).

A variação na personalidade é um importante componente da individualidade humana e essa variação é devido à interação das diferenças entre os genes e o ambiente (EAVES; EYSENCK 1975). Estudos longitudinais mostram que traços de personalidade são geralmente apresentados de maneira subclínica, antes mesmo do início do TA, e, prospectivamente, tornam-se transtornos de personalidade durante a fase sintomática do TA (BRANDES; BIENVENU, 2006). Há um consenso que existem cinco domínios básicos de traços de personalidade: extroversão,

afabilidade, conscientização, neuroticismo e abertura a novas experiências (GOLDBERG, 1993).

O neuroticismo é um traço de personalidade caracterizado por altos níveis de afetividade negativa, podendo ser definido como uma tendência a apresentar sofrimento psicológico, instabilidade emocional e baixa autoestima (EYSENCK; EYSENCK; 1985). Estudos com pares de gêmeos mostram, de forma consistente, a alta correlação entre neuroticismo e TA e depressão, bem como sua co-ocorrência. Estima-se que cerca de 50% das correlações genéticas entre esses transtornos derivem do fator genético para neuroticismo (BEESDO et al., 2009).

Também, há tentativas de associar o aparecimento de traços temperamentais, como comportamento inibido na infância, e o aparecimento de psicopatologia, particularmente sob forma de TA, na adolescência e na vida adulta. É de interesse na psiquiatria explorar o ambiente, os mecanismos neurais e cognitivos, que possam sugerir potenciais mediadores para esses efeitos (PÉREZ-EDGAR; FOX, 2005). A definição idealizada de temperamento pontua o perfil psicológico estável, com uma base fisiológica presumida, criando um padrão persistente de comportamentos que aparecem precocemente e são consistentes ao longo do tempo e lugar (KAGAN; SNIDMAN, 2001).

O Inventário de Caráter e Temperamento (TCI) descrito por Cloninger et al. (1993) define 4 dimensões de temperamento: busca por novidade; evitação de danos; dependência de recompensa e persistência (originalmente componente da dependência de recompensa). Além disso, define 3 dimensões de caráter: auto-direcionamento; cooperatividade e autotranscendência.

A evitação de danos é uma tendência herdável em que há uma resposta intensa frente a um estímulo aversivo (CLONINGER, 1987). Esse temperamento é,

sistematicamente, associado com os TA, como por exemplo, a associação entre altos níveis de evitação de danos em pacientes com TP quando comparados àqueles indivíduos saudáveis (AMPOLLINI et al., 1999).

O Comportamento inibido (CI) é um temperamento caracterizado por uma tendência a evitar situações novas e não-familiares resultando em cautela e afastamento (KAGAN et al., 1984). O CI é observável em protocolos laboratoriais tão cedo quanto 14 meses de idade e consiste em uma tendência estável do indivíduo em ser cauteloso, quieto e comportamentalmente retraído em situações envolvendo novidades (SMOLLER et al., 2009).

A presença de CI na primeira infância tem sido associada como fator de risco para a ansiedade na infância (HIRSHFELD et al., 1992) e, particularmente, com ansiedade social (BIEDERMAN et al., 2001). Um estudo brasileiro teve como objetivo avaliar a presença de histórico infantil de ansiedade e CI em pacientes adultos com TP e TASocial, comparando com grupo controle. Os resultados confirmaram que os pacientes apresentavam maiores prevalências de ansiedade e CI (ISOLAN et al., 2005).

1.4 Serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT)

A serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT), de acordo com a revisão de Mohammad-Zadeh et al., (2008), foi isolada e caracterizada no ano de 1948 por Maurice Rapport e Irvine Page. Após décadas de investigação, a 5-HT foi considerada uma substância vasoconstritora suspeita de estar contida nas plaquetas. O nome serotonina veio da junção da palavra latina “*serum*” e da palavra grega “*tonic*”.

Em 1937, o cientista italiano Vittorio Erspamer extraiu a substância, nomeada por ele de enteramina, das células enterocromafins do trato gastrointestinal, responsável por causar uma contração do músculo liso. Em 1952, foi demonstrado que a enteramina e a 5-HT eram a mesma substância (REID; RAND, 1952).

A sinalização serotoninérgica também influencia as funções neuroendócrinas que envolvem o consumo de alimentos, sono, ritmo circadiano e atividade reprodutiva (MARTINOWICH; LU, 2008). Brodie & Shore (1957) propuseram que a 5-HT pudesse ter um papel como neurotransmissor, uma vez que havia receptores de 5-HT em áreas específicas do encéfalo dos vertebrados. Dahlstrom & Fuxe (1964) foram os primeiros a mapear, no encéfalo de ratos, os núcleos específicos contendo a 5-HT. Esses grupos de neurônios compõem o que chamamos hoje de sistema serotoninérgico. Durante o desenvolvimento embrionário humano, a 5-HT é um dos primeiros neurotransmissores a se formar, sendo detectável já na 5ª semana de gestação (SUNDSTRÖM et al., 1993).

A 5-HT é uma monoamina biogênica, similar à epinefrina, norepinefrina, dopamina e histamina. O núcleo da rafe é o principal produtor de 5-HT, dentre os núcleos do tronco encefálico, e possui projeções de fibras ascendentes para o prosencéfalo e projeções de fibras descendentes para a medula espinhal. Um pequeno número de núcleos serotoninérgicos está presente, também, na formação reticular, com fibras que permanecem localmente dentro da medula (DAHLSTROM; FUXE, 1964). Os axônios dos neurônios localizados nos núcleos da rafe inervam múltiplas regiões corticais e subcorticais do encéfalo a fim de regular o arranjo de comportamentos incluindo controle sensório-motor, cognição e humor (STRÜDER; WEICKER, 2001; MARTINOWICH; LU, 2008). A 5-HT exerce um papel importante no desenvolvimento, na funcionalidade e na plasticidade do encéfalo (LESCH, 2001).

Em uma interessante revisão, Nordquist & Oreland (2010) exploraram a hipótese de que um papel duplo da serotonina, como neurotransmissor e como fator neurotrófico, teria um impacto significativo no comportamento e no risco para o desenvolvimento de transtornos neuropsiquiátricos. Isso ocorreria devido a uma alteração durante o desenvolvimento da neurocircuitaria límbica envolvida no processamento emocional e desenvolvimento dos neurônios serotoninérgicos durante o crescimento encefálico inicial (NORDQUIST; ORELAND, 2010).

Os receptores de 5-HT são receptores filogeneticamente ancestrais, que evoluíram há mais de 750 milhões de anos atrás, e estão presentes desde os menores invertebrados até os maiores mamíferos (PEROUTKA; HOWELL, 1994). Há sete diferentes subtipos de receptores (5-HT1-7) para a 5-HT. Alguns são responsáveis por ativar proteínas ligadoras de GTP (transdutoras de sinal) que são acopladas positiva ou negativamente na via de sinalização da adenilato ciclase – adenosina monofosfato cíclica (AMPC), enquanto que outros receptores da 5-HT ativam a fosfolipase C, resultando na produção de inositol 1,4,5 – trifosfato e diacilglicerol (MATTSON et al., 2004). Os três principais subtipos de receptores 5-HT1, 5-HT2 e 5-HT3 são, somente, 25% homólogos, o que sugere uma divergência ocorrida, no mínimo, há 700 milhões de anos atrás no próprio receptor (PEROUTKA; HOWELL, 1994). Os principais subtipos exibem heterogeneidade e, também, são subdivididos dentro de 5-HT1A, 5-HT1B, entre outros (MOHAMMAD-ZADEH et al., 2008).

A 5-HT é derivada do aminoácido essencial triptofano e sua síntese depende da disponibilidade desse precursor. A síntese de 5-HT (**Figura 1**) ocorre em duas etapas: o triptofano é convertido (hidroxilado), inicialmente, em um intermediário denominado 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano hidroxilase (TPH)

(MOHAMMAD-ZADEH et al., 2008). Essa enzima é apresentada, em humanos, sob duas formas: a tipo 1 (TPH1) é a forma predominante em tecidos periféricos, enquanto que a tipo 2 (TPH2) é a enzima limitante na síntese de 5-HT no SNC (NORDQUIST; ORELAND, 2010). Em um segundo passo, a 5-HTP é descaboxilada para formar a 5-HT. A hidroxilação e a descarboxilação ocorrem quase que instantaneamente na presença de triptofano. A enzima TPH é considerada a enzima chave no metabolismo da 5-HT porque ela possui pouca afinidade a outros aminoácidos e sua distribuição é limitada para os tecidos contendo 5-HT.

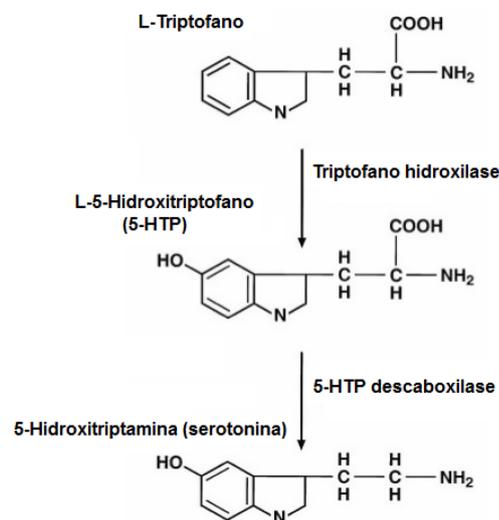


Figura 1. Síntese de serotonina a partir do seu aminoácido precursor: triptofano. Adaptado de Mohammad-Zadeh et al. (2008).

A **Figura 2** ilustra o ciclo serotoninérgico, desde sua síntese até a sua degradação. A via metabólica primária da 5-HT é realizada pela enzima monoamina oxidase (MAO) (MCISAAC; PAGE, 1958). Essa enzima é ubíqua, existindo sob duas principais formas: MAO-A e MAO-B (MOHAMMAD-ZADEH et al., 2008). A 5-HT é primariamente inativada pela MAO-A sendo essa, portanto, uma enzima-chave da degradação da 5-HT (NORDQUIST; ORELAND, 2010). O metabolismo da MAO-B

representa uma pequena porção do metabolismo da 5-HT e é uma forma predominante da MAO em plaquetas humanas (SANDLER et al., 1981).

Após a despolarização neuronal, a 5-HT é liberada dos terminais pré-sinápticos para a fenda sináptica. Ela pode ligar-se a receptores serotoninérgicos pós-sinápticos ou a auto-receptores na membrana pré-sináptica (CERRITO; RAITERI, 1979). Há poucos fatores que determinam a força e a duração da sinalização no receptor de 5-HT pós-sináptico. A abundância de 5-HT na fenda sináptica é o principal determinante desses efeitos. A ligação de 5-HT nos auto-receptores age como um *feedback* negativo contra maiores liberações de 5-HT na fenda sináptica (CERRITO; RAITERI, 1979; MOHAMMAD-ZADEH et al., 2008).

A remoção do neurotransmissor da sinapse é feita pelo transportador de serotonina (5-HTT), presente nos terminais pré-sinápticos, que o difunde para fora da sinapse (RASMUSSEN; WERGE, 2007). A 5-HT é então degradada pela enzima MAO até o ácido 5-hidroxiindoleacético (5-HIAA), seu maior metabólito, ou ela pode ser reciclada dentro de vesículas secretórias via transportador de monoamina vesicular (MOHAMMAD-ZADEH et al., 2008).

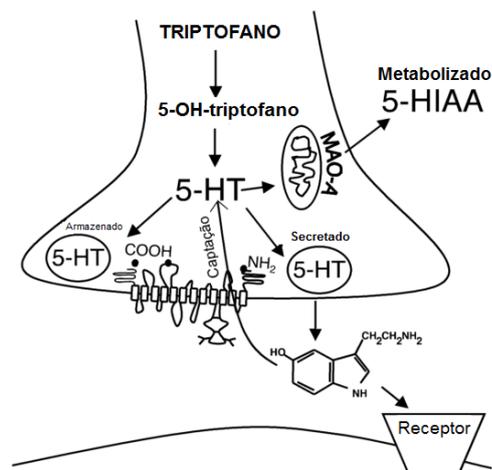


Figura 2. Descrição da sinapse serotoninérgica e manipulação da 5-HT para a síntese, estocagem, liberação, recaptação e metabolismo. 5-HIAA, ácido 5-hidroxiindoleacético. Adaptado de NI; WATTS, (2006).

O sistema de sinalização monoaminérgica possui um papel importante na manutenção do controle fisiológico do comportamento emocional e dos estados psicológicos. Um dos maiores neuromoduladores desse sistema é, portanto, a 5-HT (HADDLEY et al., 2012).

Vias de sinalização intra e intercelular que esculpem a circuitaria neuronal durante o desenvolvimento encefálico possuem papéis fundamentais na regulação da plasticidade sináptica e sobrevivência celular no encéfalo adulto. Fatores neurotróficos e neurotransmissores são duas classes principais de sinais intercelulares que medeiam a neuroplasticidade adaptativa ao longo da vida. Os números de fatores neurotróficos e neurotransmissores e as vias de transdução de sinal que eles ativam são diversos e, em muitos casos, são restritos para populações particulares de neurônios dentro do encéfalo (MATTSON et al., 2004). Logo, a 5-HT representa um influente neurotransmissor que deve ser estudado com atenção devido a sua ampla funcionalidade no SNC.

1.5 Transportador de Serotonina (5-HTT; SLC6A4)

Os circuitos córtico-límbicos (hipocampo, neocórtex, amígdala, cerebelo e hipotálamo) possuem um papel importante na modulação da afetividade e da emoção. A 5-HT tem importância nessa circuitaria e o seu transportador (5-HTT) está envolvido no principal mecanismo de recaptação pré-sináptica da 5-HT da fenda sináptica para modular a neurotransmissão serotoninérgica. Esse transportador, tão importante, é pertencente à família dos transportadores carreadores de soluto dependente de íons sódio e cloro (Na^+/Cl^-) (HADDLEY et al., 2012).

O efeito do 5-HTT reduz as concentrações de 5-HT próximo às sinapses a níveis incapazes de manter a ativação do receptor pós-sináptico (OWENS; NEMEROFF, 1998). O 5-HTT está envolvido em múltiplas funções tais como humor, cognição, consumo de alimento e sono (DELBRÜCK et al., 1997).

O 5-HTT, no encéfalo e nos tecidos periféricos, é o responsável pelo transporte ativo da 5-HT para o interior dos neurônios, células enterocromafins, plaquetas e outras células. No encéfalo, o 5-HTT está situado na membrana perisináptica dos terminais nervosos e em árvores dendríticas, na proximidade dos corpos celulares contendo esse neurotransmissor no mesencéfalo e núcleos da rafe do tronco encefálico (MCLAUGHLIN et al., 1996). O 5-HTT medeia a rápida remoção e reciclagem da 5-HT liberada seguida de estimulação neuronal. Assim, o 5-HTT possui um papel crítico na regulação homeostática da magnitude, duração e distribuição espacial de sinais que chegam aos receptores de 5-HT. O 5-HTT tem algumas habilidades para transportar outras aminas endógenas tais como dopamina e, também, age como transportador de drogas que induzem reduções persistentes (meses de duração) de 5-HT acompanhada por mudanças neurodegenerativas (revisão de MURPHY et al., 2004).

O mecanismo funcional do 5-HTT baseia-se em um acesso alternativo em que um sítio único de ligação, acessível do exterior celular, liga simultaneamente íons Na^+ e Cl^- , além da 5-HT propriamente dita. Quando esse sítio está cheio, uma mudança conformacional é acionada para fechar o acesso extracelular e abri-lo para a superfície citoplasmática da membrana celular (**Figura 3**). Após a dissociação dos ligantes (5-HT e íons Na^+ e Cl^-), o íon potássio (K^+) liga-se a esse sítio para facilitar a mudança conformacional na forma anterior, ou seja, o sítio torna-se extracelularmente acessível. Nesse processo, um sítio único de ligação

multifuncional é responsável pelo movimento dos íons Na^+ , Cl^- e K^+ , além da 5-HT. O transporte de todos esses substratos do 5-HTT depende da manutenção do gradiente de concentração do íon através da membrana plasmática pelas bombas de Na^+/K^+ ATPases (revisão de MURPHY et al., 2004).

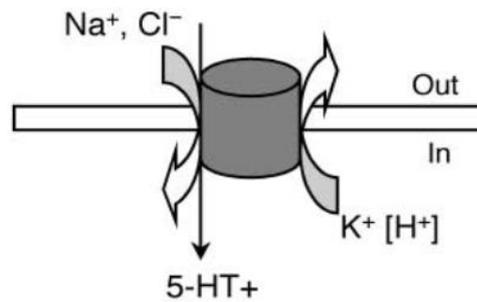


Figura 3. Esquema do movimento iônico realizado pelo 5-HTT. Retirado de NI; WATTS, (2006).

Disfunções do 5-HTT têm sido implicadas na etiologia dos transtornos psiquiátricos como humor, ansiedade, transtorno obsessivo-compulsivo e distúrbios de abuso de substâncias (OWENS; NEMEROFF, 1998; NAKAMURA et al., 2000) e, portanto, são de constante interesse em pesquisas envolvendo psiquiatria molecular.

O 5-HTT é o alvo terapêutico mais amplamente utilizado em farmacoterapia para ansiedade e depressão, através dos sítios-alvo dos fármacos denominados de inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) utilizados como antidepressivos e ansiolíticos (JOO et al., 2007; SMOLLER et al., 2009; HADDLEY et al., 2012). Esses ISRS ligam-se, especificadamente, nos 5-HTT e aumentam a disponibilidade de 5-HT na junção sináptica para o ligante do receptor. Além disso, possuem efeito adicional de inibir auto-receptores pré-sinápticos aumentando ainda mais a disponibilidade de 5-HT na fenda sináptica (OWENS, 1996).

O gene codificador do 5-HTT é denominado *SLC6A4* (*solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4*) (GELERNTER et al., 1995) e está localizado no braço longo do cromossomo 17 (posição 17q11.1-q12),

abrangendo 31 quilobases (Kb) desse cromossomo. Esse gene é composto de 14 éxons codificando uma proteína de 630 aminoácidos (o 5-HTT) que possui 12 domínios transmembranas hidrofóbicos (LESCH et al., 1994; OWENS; NEMEROFF, 1998; ARIAS et al., 2011).

Alguns polimorfismos genéticos, inclusive àqueles relacionados ao gene *SLC6A4* (**Figura 4**), são de interesse em pesquisa porque podem influenciar na manifestação de diversos comportamentos e contribuir para o entendimento das características individuais. Os minissatélites, por exemplo, são polimorfismos caracterizados por apresentarem sequências de nucleotídeos agrupados em número de 10-100 pares de bases (pb). Uma subclasse desses minissatélites é conhecida como um polimorfismo de número variável de repetições em *tandem* (VNTR). Os VNTRs apresentam algum grau de degeneração em que uma repetição pode ser levemente diferente da próxima, mas, no geral, a sequência consenso central é mantida. A maioria dos VNTRs é localizada em regiões não-codificadoras do genoma e muitos são encontrados em alta densidade nas sequências gênicas comparadas às regiões não-gênicas. Esses VNTRs são potencialmente aptos para atuarem como domínios regulatórios transcricionais. Além disso, os VNTRs podem participar da regulação da expressão gênica a outros níveis, atuando tanto em região promotora 5' quanto em outros locais do gene. Um exemplo disso refere-se àqueles VNTRs que estão na região não-traduzida do gene (UTR), que possuem importância na estabilidade do ácido ribonucléico mensageiro (RNAm), influenciando na atividade transcricional do ambiente celular (revisão de HADDLEY et al., 2012). Um polimorfismo de inserção e deleção, também considerado um VNTR "imperfeito" (por apresentar cópias variadas entre si) na região promotora do gene do 5-HTT (5-HTTLPR) será discutido a seguir, sendo de interesse para essa dissertação.

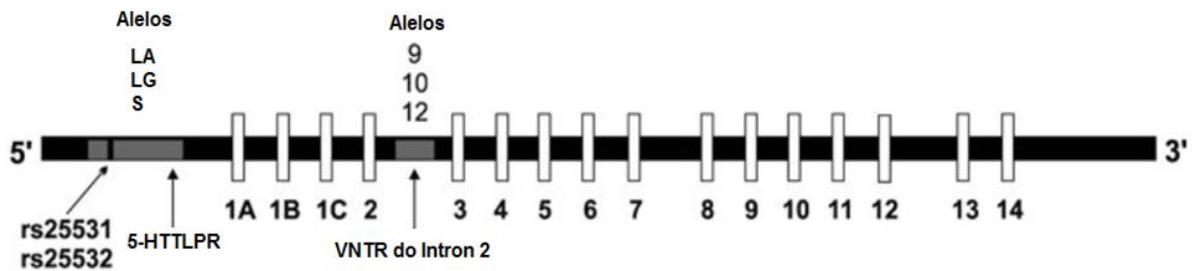


Figura 4. Representação esquemática do gene *SLC6A4* com os polimorfismos 5-HTTLPR, STin2VNTR e polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs): rs25531 e rs25532. Os 14 éxons também estão representados pelas barras. Adaptado de Haddley et al. (2012).

1.6 Polimorfismo da Região Promotora do Gene do Transportador de Serotonina (5-HTTLPR)

A região polimórfica ligada ao transportador de serotonina (5-HTTLPR) é um polimorfismo funcional presente na região promotora (região regulatória 5' proximal) do gene *SLC6A4*, localizado ~1.4 Kb acima do sítio de início da transcrição, e fonte de intensa investigação de etiologia dos transtornos psiquiátricos e fenótipos envolvidos com comportamento humano (HEILS et al., 1996; MURPHY et al., 2004; CALAPOĞLU et al., 2010).

Esse sítio polimórfico na região promotora do 5-HTT contém um número variável de cópias de 20 a 23 pb de sequências repetidas imperfeitas e ricas em citosina e guanina (HEILS et al., 1996; DELBRÜCK et al., 1997; HU et al., 2006; RASMUSSEN; WERGE, 2007). O 5-HTTLPR possui duas variantes funcionais comuns na população caucasiana: um alelo longo “L” com 16 unidades repetitivas e um alelo curto “S” com 14 unidades repetitivas (**Figura 5**). Funcionalmente, o alelo S possui menor eficiência transcricional do 5-HTT, levando à expressão reduzida e diminuição do conteúdo de 5-HTT quando comparado com o alelo L (HEILS et al.,

1996; LESCH et al., 1996; ROY et al., 2007; RASMUSSEN; WERGE et al., 2007; NEMEROFF; OWENS, 2009; PÉREZ-EDGAR et al., 2010).

Há uma diferença de 43 pb entre as variantes alélicas L e S do 5-HTTLPR, representando uma inserção/deleção na classificação bialélica do 5-HTTLPR (HU et al., 2006). Anteriormente essa região era considerada uma inserção/deleção de 44pb devido a uma citosina adicional na sequência de referência (NCBI número de acesso AF116506).

Há um terceiro alelo funcional, alelo L_G , que deriva de um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) que troca a Adenina (A) por Guanina (G) (rs25531) dentro da primeira das duas repetições extras que caracterizam o alelo L (HU et al., 2006). Os SNPs são a forma mais comum de variabilidade no genoma, ocorrendo na frequência média de 1 a cada 1000 pb na sequência de DNA (SMOLLER et al., 2009).

O alelo L_G é relativamente comum nas populações caucasianas (0.09 - 0.15) e ainda mais abundante nas populações africanas (0.24) e está associado com baixos níveis de transcrição do 5-HTT. Desta forma, o alelo L_G possui funcionalidade transcricional semelhante ao alelo S. A substituição A/G (resultando nas variantes alélicas L_A ou L_G) está localizada a 1.629 pb *upstream* do sítio de início da transcrição do 5-HTT (HU et al., 2006). O alelo L_G cria um potencial sítio de ligação para o fator de transcrição AP-2 (um dos fatores nucleares que funciona como ativador ou repressor transcricional) e isso resulta em uma reduzida eficiência transcricional desse alelo em relação ao L_A (HU et al., 2006). O genótipo de mais baixa expressão é o SS, enquanto que o $L_A L_A$ é o de maior expressão de 5-HTT. Essa funcionalidade dos alelos do 5-HTTLPR foi determinada por avaliações dos níveis de RNAm de 5-HTT em linhagens celulares linfoblastóides e células derivadas

dos núcleos da rafe transfectadas com constructos de expressão alelo-específico (HU et al., 2006). Assim, os genótipos podem ser agrupados pelo seu nível de expressividade: baixo (SS, L_GL_G, L_GS); intermediário (L_AS, L_AL_G) e alto (L_AL_A) (PARSEY et al., 2006).

O 5-HTT, como dito anteriormente, regula as concentrações de 5-HT na fenda sináptica pela reciclagem da 5-HT liberada e indivíduos com o alelo S do 5-HTTLPR, por conseguinte, apresentam concentrações extracelulares mais elevadas desse neurotransmissor durante o neurodesenvolvimento e, possivelmente, no sistema serotoninérgico maduro (LEE et al., 2005).

O 5-HTTLPR apresenta alta diversidade alélica, além das variantes clássicas L e S, que é representada pela diferença entre o número de repetições em *tandem* e o conteúdo de nucleotídeos. Raramente ocorrem alelos com um número maior de elementos repetitivos (“super-longo”, “XL” e “XXL”, com até 22 repetições) (DELBRÜCK et al., 1997; NAKAMURA et al., 2000; EHLI et al., 2011). Também, o alelo pode apresentar o mesmo número de repetições, mas essas são diferentes entre si. Esses dados demonstram a complexidade e dificuldade de genotipagem (NAKAMURA et al., 2000).

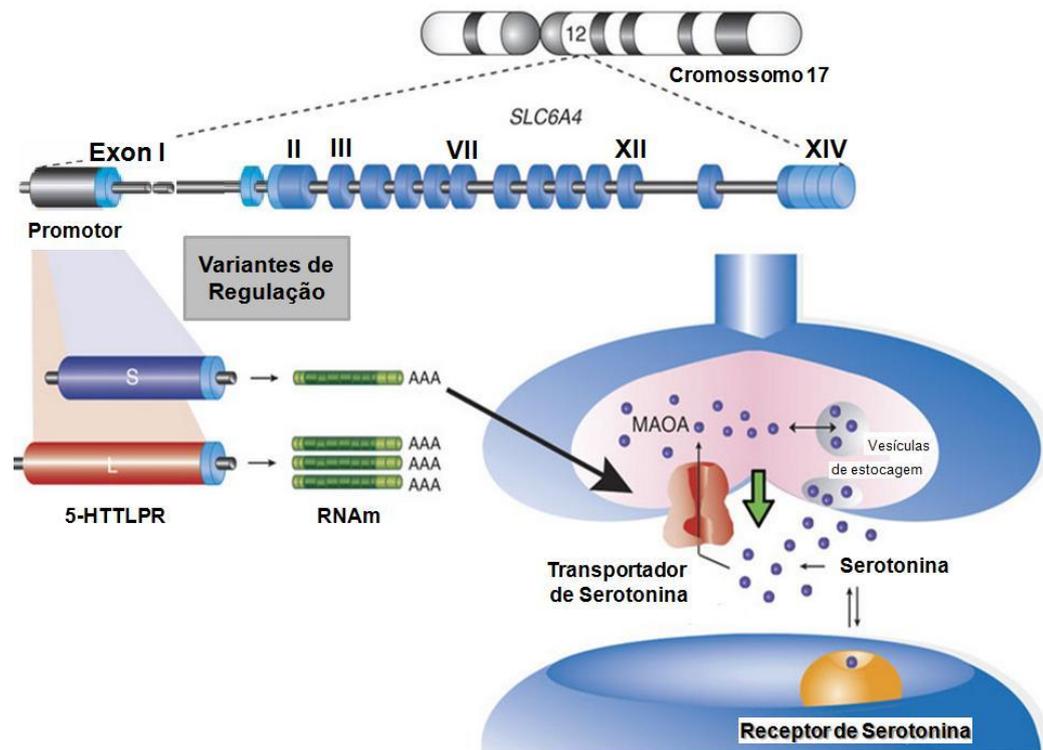


Figura 5. Demonstração da variação alélica funcional do 5-HTTLPR em transtornos relacionados à ansiedade, depressão e outras desordens que envolvam regulação emocional. A variante alélica curta “S” (em roxo) do gene do 5-HTT produz, significativamente, menos RNAm de 5-HTT e proteína (em verde) em relação à variante longa “L”. MAOA: enzima monoaminoxidase A. Adaptado de Canli; Lesch, K. Peter (2007).

Como o 5-HTTLPR interfere na expressividade do 5-HTT e esse, por sua vez, está envolvido em áreas límbicas, a pesquisa psiquiátrica tem estudado a associação desse polimorfismo e os TA e seus endofenótipos. O gene *SLC6A4* tornou-se um gene candidato ao estudo de transtornos psiquiátricos.

A evitação de danos, como um traço de temperamento, e a timidez são consideradas fatores de risco individuais para o desenvolvimento de TA na infância e na adolescência, sendo sua associação com o 5-HTTLPR uma sugestão plausível (BECKER et al., 2007). Dada a eficácia dos ISRS no tratamento dos TA, o 5-HTT, provavelmente, possui um papel considerável no mecanismo que envolve esse tipo de transtorno psiquiátrico (STRUG et al., 2010). Parece, então, razoável estudar o papel do 5-HTTLPR na etiologia desses transtornos.

1.7 Transtornos de Ansiedade e seus Endofenótipos e o 5-HTTLPR

Lesch et al. (1996), estudando duas amostras independentes, totalizando 505 indivíduos saudáveis, encontraram uma associação do alelo S do 5-HTTLPR com os traços de neuroticismo e evitação de danos. Aprofundando ainda mais o estudo inicial de Lesch et al. (1996), o grupo de pesquisa investigou a associação em uma nova amostra composta de 397 indivíduos (84% mulheres, principalmente pares de irmãos) e, novamente, foi demonstrada a associação do alelo S do 5-HTTLPR e o neuroticismo. Na amostra combinada dos dois trabalhos (n= 902), essa mesma associação foi mantida (GREENBERG et al., 2000). Por outro lado, Schinka et al. (2004) realizaram uma meta-análise envolvendo 26 estudos (7657 indivíduos) e os resultados sugerem ausência de associação significativa entre os genótipos do 5-HTTLPR e os TA. Em relação aos traços de ansiedade, eles encontraram um efeito do alelo S do 5-HTTLPR para o neuroticismo.

Gustavsson et al. (1999) avaliaram em duas amostras independentes compostas, respectivamente, de 127 e 178 indivíduos adultos saudáveis, uma possível associação entre o neuroticismo e o genótipo bialélico (alelos L e S) do 5-HTTLPR. Na primeira amostra, contrariando a hipótese inicial, eles encontraram uma associação do alelo L do 5-HTTLPR com a escala de culpa para avaliar a personalidade relacionada ao neuroticismo. No entanto, quando as duas amostras foram avaliadas em conjunto, nenhuma associação foi encontrada.

Lang et al. (2004) não encontraram associação entre o genótipo do 5-HTTLPR e traços relacionados à ansiedade, incluindo o neuroticismo quando avaliaram adultos saudáveis. Com o intuito de entender as inconsistências dos achados envolvendo o 5-HTTLPR, TA e traços de ansiedade, Schmitz et al. (2007)

atentaram para o uso dos diferentes instrumentos que avaliam o dado psiquiátrico. Eles investigaram, em uma amostra de 410 indivíduos adultos caucasianos saudáveis, a relação do 5-HTTLPR bialélico e as escalas *Neo Five-Factor Inventory* (NEO-FFI) e *Eysenck Personality Questionnaire: revised* (EPQ-R) para avaliar o neuroticismo e *Temperament and Character Inventory* (TCI) para avaliar a evitação de danos. Foi encontrada uma associação, em nível alélico (S) e genotípico do 5-HTTLPR, para o neuroticismo usando a escala EPQ-R. Com a escala NEO-FFI, a associação foi apenas em nível alélico. Não foi evidenciada associação entre o genótipo do 5-HTTLPR e a escala de evitação de danos (SCHMITZ et al., 2007).

Uma meta-análise, incluindo 24 estudos, com amostras não clínicas, não encontrou associação entre o 5-HTTLPR e o neuroticismo (MUNAFÒ et al., 2005). Alguns anos mais tarde, o mesmo autor, com outros colaboradores, investigaram mais profundamente a associação do 5-HTTLPR e traços relacionados à ansiedade. Para isso, eles realizaram uma meta-análise e acrescentaram um novo estudo, utilizando uma amostra de finlandeses. Assim, a meta-análise, envolvendo 51 estudos de adultos saudáveis, não evidenciou nenhuma associação entre a evitação de danos e o 5-HTTLPR. O neuroticismo, avaliado com a escala EPQ não se mostrou associado com o 5-HTTLPR, entretanto foi evidenciada uma associação entre os níveis mais altos desse traço, com a escala NEO, e o alelo S do 5-HTTLPR. Também, o grupo genotipou uma grande amostra, composta de 3.872 finlandeses adultos, para o 5-HTTLPR bialélico, que completou as escalas de TCI para medidas de evitação de danos e não foi encontrada nenhuma associação com esse traço de ansiedade (MUNAFÒ et al., 2009).

Calapoğlu et al. (2010) investigaram, em 94 jovens universitários turcos, o desempenho acadêmico e a influência das variações genotípicas do 5-HTTLPR.

Também, foi explorada a possível associação entre a ansiedade e o desempenho acadêmico, considerando o SNP rs25531. Os indivíduos carreadores do alelo S ou do alelo L_G apresentaram maiores escores de ansiedade. Não houve associação direta, de acordo com a classificação bialélica e trialélica do 5-HTTLPR, entre a performance acadêmica e os grupos genotípicos. Contudo, os estudantes com os genótipos LL ou L_AL_A tiveram os menores níveis de traços de ansiedade e a pior performance acadêmica.

Outro estudo, com 759 indivíduos caucasianos maiores de 18 anos de idade, também não evidenciou associação entre traços relacionados à ansiedade (neuroticismo, afeto negativo e comportamento inibido), TA e sintomas depressivos e o genótipo bialélico do 5-HTTLPR (JORM et al., 1998). O 5-HTTLPR contribuiu com cerca de 10% para a covariância entre neuroticismo e agradabilidade em um estudo envolvendo gêmeos (JANG et al., 2001).

Mesmo com a plausibilidade biológica, Strug et al. (2010) não encontraram nenhuma associação do 5-HTTLPR, tanto bialélico quanto trialélico, e o TP em um estudo caso-controle envolvendo adultos de origem europeia e africana. Eles testaram 45 SNPs de 5 genes candidatos (5-HTT; receptor 1A de serotonina (5-HT1A); catecol-o-metiltransferase (COMT); regulador de sinalização 2 da proteína G (RGS2) e receptor de peptídeo liberador de gastrina (GRPR)) e somente encontraram associação entre os SNPs do 5-HTT e TP e entre a combinação TP + TASocial, mas não de sua região promotora (5-HTTLPR). Em uma meta-análise, Blaya et al. (2007) avaliaram 10 estudos publicados entre 1996 e 2007 e, também, não encontraram associação entre o 5-HTTLPR e o TP.

Em um estudo avaliando 67 pacientes caucasianos adultos com TP, foi demonstrado que 44,8% deles possuíam algum parente de 1º grau com o TP. Além

disso, o estudo utilizou o *Minnesota Multiphasic Personality Inventory* (MMPI), um questionário adaptado e traduzido para a cultura brasileira para avaliar traços de personalidade. A tríade neurótica do MMPI (hipocondria, depressão e histeria) não estava associada aos genótipos bialélico e trialélico do 5-HTTLPR (WACHLESKI et al., 2008).

Em um estudo baseado em família, Middeldorp et al. (2007) avaliaram, em cinco diferentes momentos, a associação entre o 5-HTTLPR e o neuroticismo, a ansiedade e a depressão. Os autores não encontraram associação do alelo S (5-HTTLPR bialélico) com as variantes estudadas e argumentam que muitos achados de associações podem ser coincidências. Além disso, eles sugerem que as análises fenotípicas sejam realizadas repetidamente e em momentos diferentes.

Em um estudo envolvendo 158 estudantes coreanos, uma versão validada do TCI foi usada a fim de comparar os escores dimensionais de personalidade, incluindo a evitação de danos, com o genótipo do 5-HTTLPR bialélico e o sexo. Não foi encontrada associação entre as medidas estudadas (JOO et al., 2007).

Becker et al. (2007) tentaram replicar a potencial associação do temperamento de evitação de danos e problemas internalizantes com o 5-HTTLPR, em 305 adolescentes, incluindo o sexo e o estresse como possíveis moderadores, em períodos precoces da vida. Não foi encontrada associação entre as variáveis investigadas.

Uma meta-análise realizada por Minelli et al. (2011) incluiu 35 estudos, entre 1996 e 2010, buscando estudar a associação entre o 5-HTTLPR e traços de personalidade relacionados à ansiedade em uma população caucasóide. Os resultados dessa meta-análise confirmaram a associação entre o genótipo SS e ansiedade. Por outro lado, quando foram analisados somente aqueles estudos que

usaram uma triagem psiquiátrica estruturada, nenhuma associação foi encontrada entre o 5-HTTLPR com os mais altos escores de traços ansiosos em indivíduos caucasianos.

As inconsistências entre os achados na literatura sobre a evitação de danos e 5-HTTLPR podem ser devido a vários fatores que incluem as diferentes medidas e instrumentos utilizados, efeitos confundidores como a idade e o sexo, tamanho amostral inadequado e diferenças étnicas entre as frequências alélicas (JOO et al., 2007).

Young et al. (2003) avaliaram, em 711 crianças gêmeas (368 monozigóticas) de um estudo longitudinal, a associação entre o 5-HTTLPR e o desenvolvimento comportamental e emocional. Os problemas internalizantes foram medidos nas idades de 4, 7, 9, 10, 11 e 12 anos usando o instrumento respondido pelos pais (*Child Behavior Checklist: CBCL*). Nenhuma associação foi encontrada, ou seja, o 5-HTTLPR, nesse caso, não contribuiu para a expressão dimensional dos problemas internalizantes das crianças.

Homberg & Lesch (2010), em um artigo de revisão, discutiram sobre a importância das variantes do 5-HTT ao longo das gerações, dentro de uma perspectiva evolucionista. Para eles, o alelo S do 5-HTTLPR, por exemplo, deve ter alguma importância adaptativa, caso contrário, não permaneceria ao longo das gerações e nem seria encontrado em outros primatas não-humanos. A explicação mais plausível é que o ambiente modula os resultados desses fatores genéticos, podendo levar tanto a resultados negativos quanto a manifestações comportamentais potencialmente positivas. Eles dão importância às evidências de uma melhora cognitiva em portadores do alelo S, o que compensaria consequências negativas de traços relacionados à ansiedade sob certas condições

ambientais. Isso, em parte, poderia explicar as inconsistências científicas sobre associações do alelo S com TA (**Figura 6**). A atividade neural intensificada em áreas do córtex pré-frontal poderia contribuir para o melhor desempenho de monitoramento e, portanto, superioridade cognitiva nos carregadores do alelo S. O córtex cingulado anterior (ACC), especificadamente, está implicado na integração das recompensas e o córtex órbito-frontal (OFC) sinaliza representações de resultados esperados e compara um resultado esperado com o atual resultado de comportamento. Por fim, a hiper-reatividade da amígdala é interpretada como uma resposta potencializada a um estímulo estressante. A amígdala medeia, também, respostas a estímulos positivos emocionalmente, tão bem como novidade e estímulo ambíguo (revisão de HOMBERG; LESCH, 2010).

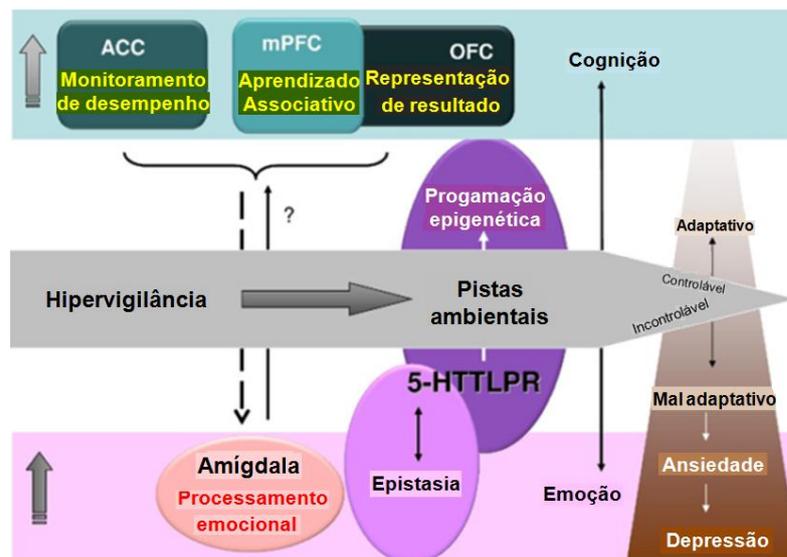


Figura 6. A variante S do 5-HTTLR está associada com hiper-reatividade das regiões corticais pré-frontais (córtex cingulado anterior, córtex pré-frontal medial, córtex órbito-frontal) e da amígdala, que contribui para a hipervigilância (aumento da sensibilidade a dicas ambientais relevantes emocionalmente). Sob condições estáveis ou incontroláveis, o resultado geralmente é emocional, levando a respostas mal-adaptativas e aumento dos riscos para transtornos de humor. Contudo, quando há estímulos que desviam a atenção da adversidade ou da recompensa, a hipervigilância pode conferir aprendizado associativo aumentado. O resultado, assim, é expresso como resposta comportamental adaptativa. Essa resposta pode ser alterada pelas modificações epigenéticas, induzidas pelo estímulo ambiental, tão bem como interações gene x gene (epistasia). 5-HTTLPR: polimorfismo da região promotora do gene do transportador de serotonina ACC: córtex cingulado anterior; mPFC: córtex pré-frontal medial; OFC: córtex órbito-frontal. Adaptado de Homberg & Lesch (2010).

Uma meta-análise incluindo 14 estudos, de 2002 a 2007, usando uma variedade de técnicas de neuroimagem e estímulos provocativos (reconhecimento de expressão facial emotiva, fotos e palavras) e populações (controles, assim como pacientes com fobia social, transtorno do pânico e depressão maior) sugere a associação do genótipo do 5-HTTLPR e a ativação da amígdala. Os pesquisadores acreditam que esse fato contribui para cerca de 10% da variância fenotípica (MUNAFÒ et al., 2008).

O genótipo SS do 5-HTTLPR está associado com volume de massa cinzenta reduzida em áreas encefálicas límbicas como a amígdala e o córtex cingulado perigenual, além disso, há uma associação com a reatividade aumentada da amígdala e relativo desacoplamento do circuito amígdala-cingulado em indivíduos saudáveis em resposta a um estímulo de medo (PEZAWAS et al., 2005). Alguns estudos replicaram a associação entre o alelo S do 5-HTTLPR e a reatividade aumentada da amígdala para estímulo emocional (HARIRI et al., 2002; FURMARK et al., 2004).

Hariri et al. (2002) utilizaram imagem por ressonância magnética funcional (IRMf) em duas coortes independentes, de voluntários saudáveis, e avaliaram o 5-HTTLPR associado à resposta fisiológica da amígdala durante o processamento frente a um estímulo de medo. Eles dividiram os sujeitos em dois grupos baseados nos genótipos do 5-HTTLPR: indivíduos com uma ou duas cópias do alelo S (grupo "S") e indivíduos homocigotos para o alelo L (grupo "L"). Durante a IRMf, todos os sujeitos completaram um paradigma em que a tarefa de controle sensório-motora foi intervalada com uma tarefa de emoção que exigiu que os voluntários escolhessem o afeto (raiva ou medo) de uma de duas faces que se apresentavam simultaneamente. Comparações diretas demonstraram que a resposta da amígdala direita foi maior no

grupo “S” quando comparada ao grupo “L”. O aumento da ansiedade e o medo associado com indivíduos carreadores do alelo S podem refletir a hiperresponsividade da amígdala frente a estímulos ambientais relevantes.

Furmark et al. (2004) estudaram, em 17 indivíduos com fobia social, a relação do 5-HTTLPR bialélico na atividade da amígdala e a gravidade dos sintomas. O fluxo sanguíneo da região cerebral na amígdala durante a tarefa ansiogênica de falar em público, comparado com as medidas basais, além do estado de ansiedade, depressão e neuroticismo foram relacionados ao genótipo bialélico do 5-HTTLPR. A presença do alelo S do 5-HTTLPR foi associada com traços elevados de ansiedade e escores de depressão, com uma tendência também ao neuroticismo, nos indivíduos com fobia social. Os indivíduos com o alelo S exibiram excitabilidade aumentada da amígdala direita, mas não na esquerda, quando realizaram a tarefa de falar em público. Os resultados apoiaram uma determinada relação genética entre funções serotoninérgicas, propensão à ansiedade e uma região encefálica central para experiência emocional, percepção e processamento de emoção aversiva. A excitabilidade da amígdala durante a provocação de ansiedade deve servir como um endofenótipo adequado para análises genéticas de condições neuropsiquiátricas (FURMARK et al., 2004).

Lau et al. (2009) estudaram 31 adolescentes com TA recorrentes ou depressão e 33 indivíduos saudáveis para explorar os efeitos dos genótipos do 5-HTTLPR, diagnóstico e suas interações na atividade da amígdala em resposta ao teste das faces. Adolescentes saudáveis, com no mínimo uma cópia do alelo S ou alelo L_G, mostraram respostas mais fortes da amígdala para faces de medo em comparação aos adolescentes saudáveis que não apresentavam esses alelos. Em se tratando dos pacientes, os homozigotos para o alelo L_A exibiram melhores

respostas da amígdala para faces de medo em relação aos pacientes com os alelos S ou L_G. Assim, houve uma interação genótipo-diagnóstico-face-emoção na atividade da amígdala direita.

Battaglia et al. (2005) incluíram a timidez como possível preditor de TA e estudaram 49 crianças (média de 9 anos de idade) utilizando também o teste para a avaliação da expressão facial. Nesse estudo, as crianças que apresentaram os mais altos níveis de timidez ou possuíam uma ou duas cópias do alelo S para 5-HTTLPR tiveram padrões diferentes de processamento afetivo ao estímulo de hostilidade interpessoal.

O viés atencional é descrito como uma tendência em focar, ou manter a atenção, em uma classe de estímulos ambientais em detrimento de outros. O viés atencional, tanto para valências negativas quanto para positivas, pode ser considerado um fenótipo intermediário para os TA porque está relacionado à resiliência emocional e à vulnerabilidade a algum transtorno psiquiátrico (FOX et al., 2009). Em um estudo envolvendo 112 adolescentes e análise do viés atencional para a ameaça, relacionando-o ao genótipo do 5-HTTLPR, observou-se que os carreadores do alelo S apresentavam maior vigilância para a ameaça que os indivíduos com o alelo L. Esse fato pode ser uma resposta neurobiológica a algo negativo e processamento de estratégias para percepção de estímulos ameaçadores. Para faces felizes, os adolescentes com baixa neurotransmissão do 5-HTT (SS, L_GL_G ou SL_G) mostraram menos vigilância em comparação ao grupo de maior neurotransmissão (L_AL_A) (PÉREZ-EDGAR et al., 2010). Seguindo essa mesma ideia, Pergamin-Hight et al. (2011), através de uma meta-análise, corroboraram esse achado. Eles encontraram associação entre os carreadores de baixa transmissão do 5-HTTLPR e a atenção seletiva para estímulo negativo. Fox et al. (2009)

encontraram, em 97 adultos saudáveis, uma associação entre os homozigotos para o alelo L do 5-HTTLPR e a atenção voltada para o estímulo positivo.

1.8 Efeitos Epistáticos (G x G) e interações Gene x Ambiente (G x A)

A 5-HT e o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), frequentemente, atuam de maneira cooperativa para regular a plasticidade neuronal e a sobrevivência celular. Prejuízos na sinalização da 5-HT e do BDNF são encontrados na depressão e TA, mas podem também ter um papel importante na patogênese de vários outros transtornos, como àqueles dependentes de idade (MATTSON et al., 2004). Há muitas evidências experimentais que demonstram a interconexão funcional entre o sistema serotoninérgico e o BDNF, especialmente na neurogênese e plasticidade sináptica (MARTINOWICH; LU, 2008).

Em um estudo caso-controle, envolvendo adolescentes, Tochetto et al. (2011) encontraram uma associação do alelo Met do BDNF e os TA, porém não houve associação entre os traços relacionados à ansiedade (comportamento inibido e evitação de danos) e o genótipo ValMet do BDNF. Uma possível interação do BDNF com o 5-HTTLPR poderia ser considerada e estudada nesse caso.

Os efeitos epistáticos entre o polimorfismo Val66Met do BDNF e o 5-HTTLPR no neuroticismo foram avaliados em uma grande amostra de indivíduos da Sardenha/Itália (n= 2333), com idades entre 14 e 94 anos e com fenótipo relacionado à depressão. Entre os carreadores do genótipo LL do 5-HTTLPR, os indivíduos com a variante Met do BDNF apresentaram maiores níveis de neuroticismo comparados àqueles com o alelo Val. Nenhuma diferença foi observada entre os carreadores do alelo S do 5-HTTLPR. Os achados descrevem uma associação entre o alelo Met do

BDNF e introversão e sugerem que o BDNF interaja com o 5-HTTLPR para influenciar o desenvolvimento do neuroticismo (TERRACCIANO et al., 2010).

Arias et al. (2011) objetivaram testar, em uma amostra espanhola saudável, a associação individual do 5-HTTLPR, o polimorfismo Val66Met do BDNF e polimorfismo T1521C do gene do receptor gabaérgico alfa6 (GABRA6) com traços relacionados à ansiedade. Esse estudo visava explorar, também, as interações G x G. Para isso, 937 indivíduos responderam à escala TCI para explorar a dimensão de evitação de danos e uma subamostra respondeu a um questionário explorando o neuroticismo. Houve uma significativa interação G x G entre os polimorfismos do *SLC6A4* e BDNF na evitação de danos, o que poderia explicar, em parte, a base genética subjacente à ansiedade. Contudo, quando a associação individual de cada polimorfismo e a subdimensão da evitação de danos foi testada, o estudo não encontrou resultado significativo. Esses dois polimorfismos juntos modularam os escores de dimensão da evitação de danos, mas não sozinhos. Assim, análises de efeitos simples mostraram que sujeitos com o genótipo MetMet e SS possuíam escores mais elevados para a evitação de danos quando comparados àqueles MetMet/LS ou MetMet/LL. Nenhuma outra interação G x G foi significativa em relação ao neuroticismo.

Defrancesco et al. (2011) aplicaram duas tarefas computadorizadas para o reconhecimento de emoções em faces e para testar a habilidade em discriminar as diferentes intensidades de felicidade e tristeza, em 88 mulheres caucasianas saudáveis, relacionando-as aos genótipos bialélico do 5-HTTLPR e o polimorfismo Val158Met do gene da enzima catecol-o-metiltransferase (COMT). Na tarefa de reconhecimento, as carreadoras do alelo S tiveram um pior desempenho no reconhecimento de faces felizes, porém, foram melhores em reconhecer faces de

medo quando comparadas às homozigotas para o alelo L. Os genótipos do 5-HTT e da COMT não influenciaram na habilidade em discriminar entre as diferentes intensidades de tristeza ou felicidade. Além disso, não houve interação entre os dois polimorfismos nas tarefas.

As interações G x A podem ser interessantes porque, muitas vezes, o alelo S é visto dentro de um conceito de “vulnerabilidade conferida pelo gene” ao invés de “plasticidade do gene”. Indivíduos com o alelo S, em algumas pesquisas, podem ser mais vulneráveis a efeitos negativos em uma situação adversa, porém, podem ter mais benefícios quando o ambiente é positivo (UHER; MCGUFFIN, 2008).

Estudos com animais são úteis em avaliar interações G x A. Em um interessante estudo, os pesquisadores dividiram fêmeas grávidas ou lactantes em dois diferentes ambientes: neutros e “perigosos/adversos”. Eles avaliaram os filhotes dessas fêmeas e os agruparam de acordo com os diferentes genótipos do 5-HTT (camundongos *knockout* para o 5-HTT (-/-); (-/+ e (+/+)) em simulação aos genótipos do 5-HTTLPR. Os pesquisadores estudaram os filhotes em diferentes testes comportamentais (labirinto em cruz elevado, teste do campo aberto, teste da luz/escuro) para traçar o perfil comportamental. Os resultados demonstraram que o ambiente prejudicial induziu aumento de comportamento ansioso e diminuiu a locomoção exploratória dos filhotes, sendo os efeitos mais pronunciados em camundongos com a expressividade do gene do 5-HTT reduzida. Esse estudo demonstrou a influência precoce de um estímulo adverso associado à presença de vulnerabilidades genéticas e suas consequências no futuro (HEIMING et al., 2009; HEIMING; SACHSER, 2010).

Para o grupo de Caspi et al. (2003), a interação G x A envolvendo eventos estressores e indivíduos carreadores do alelo S do 5-HTTLPR, mas não do alelo L,

predizem um diagnóstico de depressão. Esse trabalho influenciou, amplamente, a pesquisa em psiquiatria. Os pesquisadores realizaram um estudo prospectivo longitudinal em 1037 crianças neozelandesas, em intervalos regulares, até os 26 anos de idade. O trabalho avaliou os eventos estressores ocorridos ao longo da vida entre os 21 e 26 anos de idade e sua interação com o 5-HTTLPR e o desenvolvimento de depressão na vida adulta. Os indivíduos com o alelo S e com evento estressor depois dos 21 anos de idade tiveram um aumento de sintomas depressivos e comportamento/ideia suicida, enquanto que os homozigotos para o alelo L não apresentaram essa manifestação. Além disso, os pesquisadores avaliaram a presença de maus-tratos que ocorreram entre 3 e 11 anos de idade e constataram que os traumas infantis predizem depressão em adultos, mas somente naqueles indivíduos com o alelo S e não entre os homozigotos para o alelo L.

Em um estudo longitudinal, com 309 adultos, Laucht et al.(2009) buscaram avaliar a interação entre o genótipo bi e trialélico do 5-HTTLPR e a adversidade familiar no desenvolvimento de depressão, de TA e na evitação de danos. Os dados foram obtidos quando os indivíduos tinham 19 anos de idade. Os resultados desse estudo indicaram uma interação entre as adversidades familiares e o diagnóstico de depressão ou ansiedade para os sujeitos carreadores do alelo L ou L_A , assim como a maior adversidade foi associada com aumento dos transtornos em homozigotos LL e L_AL_A . Em relação ao traço de temperamento estudado, nenhuma interação foi encontrada.

Koenen et al. (2011) consideraram os níveis de metilação (principal mecanismo epigenético) do *SLC6A4* em uma amostra de 100 indivíduos adultos com TEPT. Foram avaliados o número de eventos traumáticos e a influência do genótipo *SLC6A4* para o desencadeamento do TEPT ou resiliência frente à

exposição ao trauma. Os autores encontraram uma forte associação entre o número de eventos traumáticos com o risco para o desenvolvimento de TEPT, mas somente para os indivíduos que apresentavam baixos níveis de metilação. Já os indivíduos com os maiores níveis de metilação para o *SLC6A4* e com mais eventos traumáticos, apresentaram um efeito protetor para o transtorno.

As inconsistências dos achados na literatura psiquiátrica podem ser explicadas, em parte, pelo SNP rs25531, gerando os alelos L_A e L_G (CALAPOĞLU et al., 2010; MINELLI et al., 2011). Muitos estudos não consideraram essa variante L_G que possui baixa expressividade, semelhante ao alelo S do 5-HTTLPR.

Os achados dos diferentes estudos demonstram a complexidade de interações que podem modular a vulnerabilidade para o desenvolvimento de psicopatologias, incluindo àquelas relacionadas aos TA.

2. JUSTIFICATIVA

Os TA são prevalentes na infância e na adolescência e possuem considerável herdabilidade, ainda mais quando o temperamento é considerado. Esses transtornos, nesse período da vida, estão associados a prejuízos familiares, sociais e funcionais e suas manifestações podem continuar na vida adulta. Os endofenótipos relacionados à ansiedade (comportamento inibido e evitação de danos) estão associados aos TA e a sua etiologia requer maiores investigações em nível biológico.

A plausibilidade biológica de genes serotoninérgicos estarem associados à ansiedade (plasticidade neuronal, sítio de ação dos fármacos ansiolíticos, entre outros) justificaria o seu estudo em uma população adolescente. Os dados científicos sobre o 5-HTTLPR e sua associação com TA, comportamento inibido ou evitação de danos ainda são controversos e indicam a necessidade de novos estudos em amostras diferentes.

A utilização de uma classificação dialélica e trialélica do 5-HTTLPR, em um estudo de associação, enriquecerá os dados da literatura (escassos em relação a essa classificação).

A compreensão dos mecanismos pelos quais os TA e seus endofenótipos se desenvolvem pode possibilitar que medidas preventivas e de intervenção precoce sejam dirigidas a subgrupos com maior risco para o desenvolvimento desses transtornos.

3. OBJETIVOS

Investigar, em uma amostra comunitária de adolescentes, a associação entre o genótipo bialélico e trialélico do 5-HTTLPR e os traços relacionados à ansiedade (comportamento inibido e evitação de danos) e o diagnóstico de TA, usando metodologias combinadas: caso-controle e estudo baseado em família.

Avaliar a frequência do alelo S do 5-HTTLPR, considerado alelo de risco para os TA, em adolescentes com TA em comparação com o grupo controle.

Observar a frequência do alelo S em adolescentes com ansiedade e a frequência desse alelo nos endofenótipos de ansiedade (comportamento inibido e evitação de danos).

Realizar o teste de desequilíbrio de transmissão (TDT), no estudo de família, para estudo de associação entre o 5-HTTLPR e os TA e seus endofenótipos (comportamento inibido e evitação de danos).

4. HIPÓTESES

Os adolescentes com diagnóstico de TA apresentam uma maior frequência do alelo S do 5-HTTLPR em comparação à frequência alélica do grupo controle.

O alelo S do 5-HTTLPR está associado aos TA e seus endofenótipos (comportamento inibido e evitação de danos) no estudo caso-controle.

O alelo S do 5-HTTLPR está associado aos TA e seus endofenótipos (comportamento inibido e evitação de danos) no estudo baseado em família.

5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. O projeto aprovado é identificado pelo número 10.0330.

6. ARTIGO

Artigo a ser submetido à revista *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* (fator de impacto 2.877).

Anxiety Disorders and Anxiety-related Phenotypes and Serotonin Transporter Gene-linked Polymorphic Region (5-HTTLPR) in Adolescents: Case-Control and Trio Study

Andressa Bortoluzzi ^{a,b,c}, Carolina Blaya ^{a,e}, Giovanni Abrahão Salum ^{a,d}, Carolina Cappi ^f, Sandra Leistner-Segal ^c, Gisele Gus Manfro ^{a,b,d,*}

^a Anxiety Disorders Outpatient Program for Children and Adolescents, PROTAIA, Federal University of Rio Grande do Sul, UFRGS / Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Brazil

^b Post Graduate Program in Neuroscience. Institute of Basic Sciences/Health, Federal University of Rio Grande do Sul, UFRGS, Brazil

^c Basic Research and Advanced Investigations in Neurosciences, BRAIN Laboratory, HCPA, Brazil

^d National Institute of Developmental Psychiatry for Children and Adolescents (CNPq/Brazil)

^e Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brazil

^f São Paulo University

* Corresponding Author at:

Hospital de clínicas de Porto alegre, Ramiro Barcelos, 2350-Room 2202.

Porto Alegre, RS, Brazil

Phone/Fax: (+55 51) 93232433

E-mail: andresbt10@yahoo.com.br; gmanfro@gmail.com

ABSTRACT

Background: Genetic components have been related with Anxiety Disorders (AD) and anxiety-related traits. The serotonin transporter gene-linked polymorphic region (5-HTTLPR) is a functional polymorphism and shown to be relevant in association studies in psychiatric.

Aim: To investigate if AD and anxiety-related phenotypes (harm avoidance and behavioral inhibition) are associated with 5-HTTLPR in adolescents, integrating both a case-control and a family-based design in a community sample.

Methods: A total of 510 subjects participated in this study. Participants were 225 adolescents (129 anxiety cases and 96 controls; both groups from the community) and their biological families (194 mothers, 63 fathers and 22 siblings). We assessed psychiatric diagnosis using The Schedule for affective Disorder and Schizophrenia for School-Age children Present and Lifetime Version (K-SADS-PL). The Temperament and Character Inventory (TCI) and an adaptation of the Resnick Behavioral Inhibition Scale were used in order to measure harm avoidance and behavioral inhibition, respectively. The molecular analysis was performed in DNA from saliva sample of the adolescents and their families. The sample was evaluated for presumed serotonin transporter gene expression based on 5-HTTLPR: low (L_G/S , L_G/L_G , and S/S), intermediate (L_A/L_G and L_A/S) or high (L_A/L_A).

Results: We found no associations between 5-HTTLPR in AD and anxiety-related phenotypes (harm avoidance and behavioral inhibition) in both case-control and trio analysis.

Conclusion: Our results do not support a major role of 5-HTTLPR for anxiety disorders and anxiety-related phenotypes in adolescents. In the face of mixed

results, further investigations and meta-analytic studies are needed in order to clarify if there is an association between 5-HTTLPR and anxiety-related phenotypes.

Keywords: Anxiety disorders; Anxiety traits; Adolescents; 5-HTTLPR; Genetic association

1. INTRODUCTION

Anxiety disorders are prevalent in childhood and adolescence and are associated with impairments in academic, social and family functioning (Beesdo et al., 2009; Rockhill et al., 2010). Family studies suggested that anxiety disorders are familial and twin studies reported a heritability of 30 to 40% (Hettema et al., 2001). Some authors described that heritability increases to almost 90% if anxiety temperament traits are considered (Dilalla et al., 1994), therefore studies investigating both diagnostic and broad temperament phenotypes are needed in order to provide insights into the genetics of anxiety disorders.

The serotonin neurotransmitter (5-HT) plays an important role in development and in the plasticity of brain (Lesch, 2001). Furthermore, the serotonin transporter gene (5-HTT; SLC6A4) removes 5-HT from the synaptic cleft into the pre-synaptic terminals and is considered a target site of selective serotonin reuptake inhibitor (SSRIs), recognized as an anxiolytic drug (Joo et al., 2007). Human and animal studies have associated the serotonin transporter gene - linked polymorphic region (5-HTTLPR) genotype to the development of anxiety disorders (Calapoglu et al. 2010; Hu et al., 2006; Jennings et al., 2006), but others studies did not replicate these findings (Blaya et al., 2007; Strug et al., 2010).

In addition, some authors have suggested that anxiety-related phenotypes such as temperament traits of behavioral inhibition (BI) and harm-avoidance (HA) may be more amenable to genetic analysis than are the disorders themselves (Smoller et al., 2009; Domschke and Reif, 2012). BI is a temperament characterized by the tendency to avoid novel and unfamiliar situations with precaution and withdrawal (Kagan et al.; 1988). HA, on the other hand, represents a heritable tendency to avoid intensely aversive stimuli (Cloninger, 1987). Similar to the findings

with anxiety disorders as clinical syndromes, some studies have described an association between 5-HTTLPR and anxiety-related traits (Greenberg et al., 2000; Lesch et al., 1996), while others reported negative results (Gustavsson et al., 1999; Lang et al., 2004; Wachleski et al., 2008).

Case-control designs have shown to be useful designs in psychiatry in order to compare prevalence of specific common variants in candidate genes in the population and testing specific hypothesis (Sullivan et al., 2001). In counterpart, family-based studies can in some circumstances be more robust than a case-control or multiple-case family-based approach alone, because they have the advantage of controlling the population stratification effects (Manor et al., 2001). Therefore, combining strategies seems an interesting approach to both increase power and prevents results due to population stratification. The case-control-family design allows additional comparisons between sets of relatives of cases and corresponding groups of relatives of controls, if the two groups are studied with the same protocols and attention (Hopper et al., 2005).

Very few studies (Becker et al., 2007; Lau et al., 2009) have investigated the association between 5-HTTLPR and anxiety disorders or anxiety-related traits in adolescence. Moreover fewer studies have used a multi-phenotypic approach beyond diagnosis. Therefore, the aim of this study was to examine the association between the 5-HTTLPR genotype and anxiety disorders as well as anxiety-related phenotypes in a community sample of adolescents using both case-control and family-based methodology combined.

2. METHODS

2.1 Sample Selection

Subjects came from a larger cross sectional anxiety disorder study with adolescents from schools that belong to the sanitary area of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), an University Hospital located in the south of Brazil. This study was approved in its ethical and methodological aspects in accordance with the resolutions 196/96 of Health National Council (10-0330). All participants gave their written informed consent in order to participate in the study.

Details about sampling procedures are described elsewhere (Salum et al., 2011). Briefly, all subjects above the 75th percentile in the Screen for Child and Anxiety related Emotional Disorders (SCARED) (Birmaher et al., 1999; Isolan et al., 2011) and their parents were invited to undergo a diagnostic and genetic evaluation. Besides this, a random sample of controls equally distributed in the other three quartiles of the SCARED was invited to participate in the same psychiatric evaluation. Individuals that fulfill diagnostic criteria for Separation Anxiety Disorder, Social Anxiety Disorder, Generalized Anxiety Disorder and Panic Disorder in the psychiatric diagnostic assessment (described below) were considered cases and non-anxious individuals were classified as the control group. Individuals with: (1) significant organic illness; (2) history of bipolar disorder, pervasive developmental disorder or any psychotic disorder; (3) history of alcohol or drugs dependence or abuse; and (4) clinical suspicious of mental retardation were excluded from this study. We also excluded subjects whose genotype was unclearly defined. Sample selection procedures specified for each design is described below.

2.2 Participants

The initial sample comprised 240 adolescents and their family members (208 mothers, 65 fathers and 25 siblings) that accepted to participate in this psychiatric diagnostic assessment and provided biological material (saliva) for DNA study.

This study is composed of two different designs. First we analyzed data from the adolescent sample in order to have a case-control study that evaluated the association between anxiety disorders and anxiety traits and the 5-HTTLPR. For this analysis, only unrelated individuals were included ($n = 234$). Six subjects were excluded due to mental retardation (3 controls and 3 cases) and three subjects were also excluded (1 control and 2 cases) because of the presence of an allele out of the expected pattern (genotyping nonspecific). No subjects were excluded due to significant organic illness, history of bipolar disorder, pervasive developmental disorder or any psychotic disorder or history of alcohol or drugs dependence or abuse. The final sample involved 225 adolescents (68% females; mean age = 12.80, SD = 2.38): 129 cases (74.4% females; mean age = 12.98, SD = 2.37; 66.1% Caucasians) and 96 controls (59.4% females; mean age = 12.57, SD = 2.40; 73.1% Caucasians).

Family-based analysis involved the same initial sample of adolescents and their families, but included the 6 related siblings. Eight mothers, one father and one sibling were excluded from statistical analysis because of the presence of an undefined allele. The final sample involved 510 subjects: 231 adolescents (68.4% females; mean age = 13.43, SD = 2.38), 194 mothers, 63 fathers and 22 siblings.

2.3 Psychiatric Diagnosis

The psychiatric diagnostic was assessed throughout a clinical interview and The Schedule for Affective Disorder and Schizophrenia for School-Age Children-Present and Lifetime Version (K-SADS-PL), which is a semi-structured interview based on the DSM-IV criteria (Kaufman et al., 1997), with the mother and/or father and with the adolescent by psychiatrists or residents in psychiatry trained in the diagnostic interview procedure. Results were further discussed with senior

psychiatrists and best-estimate diagnoses were determined after reviewing generated diagnoses, symptoms and impairment level (total number of interviewers = 6, kappa = 0.93 across anxiety disorders).

2.4 Dimensional Anxiety-related Phenotypes

Cloninger's Temperament and Character Inventory (TCI) (Cloninger et al., 1993) was used to assess harm avoidance. The TCI is a personality self-report instrument with 240 items in a true-false response format that has already been validated to Brazilian population. It is based on Cloninger's psychobiological model of personality and presented good psychometrics properties (Gonçalves and Cloninger, 2010). For this specific analysis only the harm-avoidance sub-scale was used for analysis.

The Retrospective Self-report Scale of Behavioral Inhibition (RSRI) (Reznick et al., 1992) is a scale that contains 30 items and was used to assess childhood behavior inhibition. This scale was adapted from adults in order to measure current inhibition in the scholars and has already been used in other studies with adolescents (Tocchetto et al., 2011).

2.5 Genotyping

DNA was extracted from saliva sample, using Oragene™ Kits (DNA Genotek, Ottawa, Ontario, Canada). A variable number of repeat tandem in 5-HTTLPR was genotyped using standard Polymerase Chain Reaction (PCR). Primers sequences were previously described: forward primer (5'-GGCGTTGCCGCTCTGAATGC-3') and reverse primer (5'-GAGGGACTGAGCTGGACAACCAC-3') (Hu et al., 2006). This primer pair amplified a 486-bp product for the 14-repeat short S allele and 529-bp for the 16-repeat long L allele representing the difference (insertion/deletion) of

43-bp between these alleles. PCR was performed in a total volume of 25 μ l, including 1 μ l de DNA; 20pmol of each primer; 2% DMSO; 0.1 mM of dATP, dCTP, dTTP, and of dGTP; 10mM Tris (pH 8.3); 50mM KCl; 1.5mM MgCl₂, and 1U Taq DNA Polymerase. The programmed conditions for PCR were as follow: 3 minutes initial denaturation at 94°C, followed by 30 cycles of 94°C for 40 seconds, 60°C for 1 minute, 68°C for 1 minute and a final extension of 68°C for 10 minutes. The PCR fragments were separated on a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. This procedure allowed the biallelic genotype classification (L and S). We used a restriction fragment length polymorphism (RFLP) method that allows for determination of variants (S, L_A, and L_G). Thus, a restriction enzyme *MspI* was used to digest the PCR product and to allow visualization of the three 5-HTTLPR alleles (L_A, L_G and S) on a 3% agarose gel stained with ethidium bromide for the triallelic genotype classification. This digestion was performed overnight at 37 °C.

2.6 Statistical Analyses

Data were presented as mean \pm standard deviation, absolute and relative frequency (%). Analysis was carried on using the biallelic (L vs. S) and the triallelic classification (L_A, L_G and S). The triallelic genotypes were analyzed considering their level of expression as follows: L_G/S, L_G/L_G, and S/S were reclassified as S'S'; the L_A/L_G and L_A/S were reclassified as L'S', and finally L_A/L_A was reclassified as L'L' as previously suggested by other studies (Parsey et al., 2006).

For the case-control analysis, the allelic test was conducted using the Chi-square-test, linear and logistic regressions controlling for ethnicity and gender.

The analyses and the test of Hardy–Weinberg Equilibrium (HWE) were performed using PLINK software (Purcell et al., 2007). The overall level of significance adopted was $\alpha = 0.05$. Family data were analyzed using transmission

disequilibrium test (TDT). We also performed family-based analysis for quantitative traits (HA and BI), using the QFAM test, which is a linear regression that uses the permutation to correct the dependence within family.

3. RESULTS

3.1 Case-Control Analysis

Table 1 depicts descriptive statistics from the case-control association design. Regarding genetic analysis, no association was found between the presence of S-allele of 5-HTTLPR and anxious and non-anxious adolescents in both case-control biallelic 5-HTTLPR analysis and S'-allele triallelic 5-HTTLPR analysis (Table 2). In addition, no association was found between behavioral inhibition and harm avoidance and S-allele in both biallelic and triallelic 5-HTTLPR analysis (Table 2). Our results were controlled for ethnicity and gender with logistic and linear regression (data not shown).

3.2 Family-based Analysis

The family-based study included 510 subjects (71.78 % females) in 231 nuclear families. Among these nuclei, there were 69 adolescents with 2 parents in 57 nuclear families, 174 adolescents with 1 parent in 153 nuclear families and 21 adolescents without parents' data. There were 35 affected offspring informative trios. No mendelian error was found in total analysis. The sample was in Hardy-Weinberg equilibrium (biallelic 5-HTTLPR p-value = 0.804; triallelic 5-HTTLPR p-value = 0.633). Considering these data, no association was found in trio analysis with anxiety disorder and the biallelic or triallelic 5-HTTLPR analysis (Table 3).

Considering anxiety-related traits (HA and BI) we also did not find any association on the QFAM test either with harm avoidance or with behavioral inhibition in both biallelic and the triallelic 5-HTTLPR genotype (Table 4).

4. DISCUSSION

Our study reports no association between the 5-HTTLPR polymorphism and anxiety disorder or anxiety-related phenotypes in both case-control and family-based designs. As we previously stated, evidence of association between 5-HTTLPR and anxiety disorders and anxiety-related phenotypes is mixed. Our findings are in accordance with studies that did not find such association for anxiety disorders (Blaya et al., 2010; Jorm et al., 1998; Narasimhan et al., 2011; Strug et al., 2010).

It has been discussed that the heritability of anxiety disorder is much more dependent on its traits than the diagnosis itself. Our study also did not find an association between the 5-HTTLPR polymorphism and harm avoidance and behavioral inhibition in trios. This finding is also in accordance to other studies (Becker et al., 2007; Joo et al., 2007). On the other hand, some few authors have reported an association between 5-HTTLPR genotype and anxiety-related trait (Greenberg et al., 2000; Lesch et al., 1996).

The discordant findings considering the association between 5-HTTLPR and anxiety in the literature can be due to several reasons. First, the phenotypic characterization as well as the use of different instruments to assess traits may have an important role on conflicting results (Minelli et al, 2011). Second, methodological and technical problems due to population stratification, small sample size, as well as failures in process of genotyping may also contribute to the disagreement between the data described in the literature. Third, the different analysis using the biallelic or the triallelic 5-HTTLPR classification may lead to different outcomes. Finally, factors

associated with disease complexity such as gene x environmental interaction, and epigenetics have been shown to be important aspects to be considered in different studies (Koenen et al., 2011; Laucht et al., 2009).

Our study has some limitations. Due to the small sample size we are only able to detect moderate to major 5-HTTLPR effects on anxiety-related phenotypes. Therefore negative effects should be interpreted in the context of other results that lead to the same conclusions in different samples. But we also have some strengths. All the families included in our study came from the same epidemiological background (community, non-medicated individuals) and had an extensive psychiatric evaluation. Furthermore, we used both case-control and family based design in order to test our hypothesis, which increases power to detect positive associations in the same time avoiding population stratification problems. Moreover our study evaluates the biallelic and the triallelic genotypes that can allow a deeper analysis in relation 5-HTTLPR' functionality. This approach is very important because the majority of the available studies in the literature do not consider the SNP rs25531. So, these studies grouped the L_G and L_A alleles as if it had the same transcriptional level, which is not ideal.

5. CONCLUSIONS

We add to the recent literature reporting no association between anxiety disorders and anxiety-related phenotypes with the 5-HTTLPR, in a community sample of adolescents using two different study designs. In the face of mixed results further investigations and meta-analytic studies are needed in order to clarify if there is an association between 5-HTTLPR and anxiety-related phenotypes.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the adolescents and their families for their participation in this study.

Table 1. Descriptive of cases and controls in the total sample (n = 225)

Variables	Study Groups	
	Controls (n= 96)	Cases (n = 129)
Gender (female)	57 (59.4%)	96 (74.4%)
Age (years)	12.57 (SD = 2.40)	12.98 (SD = 2.37)
Skin Color (white)	68 (73.1%)	82 (66.1%)
Socio-economic status (disadvantage)	51 (64.6%)	59 (57.2%)
5-HTTLPR Biallelic Genotype		
LL	30 (31.3%)	44 (34.1%)
LS	49 (51%)	60 (46.5%)
SS	17 (17.7%)	25 (19.4%)
5-HTTLPR Triallelic Genotype		
L'L'	23 (24%)	37 (28.7%)
L'S'	52 (54.2%)	59 (45.7%)
S'S'	21 (21.9%)	33 (25.6%)

Abbreviations: 5-HTTLPR, Serotonin Transporter Gene-linked Polymorphic Region; SD, standard Deviation.

Table 2. Allelic Association between 5-HTTLPR with Anxiety Disorder, Behavioral Inhibition and Harm Avoidance in the case-control analysis (n=225)

5-HTTLPR	Anxiety Disorder (n=225)				Behavioral Inhibition (n= 100)			Harm Avoidance (n = 104)			
	Freq Affected	Freq Unaffected	χ^2	OR (CI95%)	p-value (asymptotic)	β	r^2	p-value (asymptotic)	β	r^2	p-value (asymptotic)
Biallelic	0.43	0.43	0.016	0.98 (0.67-1.42)	0.900	- 0.076	0.028	0.096	0.958	0.011	0.291
Triallelic	0.48	0.49	0.011	0.98 (0.67-1.42)	0.915	- 0.076	0.028	0.094	0.260	0.0008	0.770

Abbreviations: 5-HTTLPR, Serotonin Transporter Gene- linked Polymorphic Region; χ^2 , chi-squared test; OR, Odds Ratio; CI, confidence interval; β , regression coefficient; r^2 , regression r-squared; p, Wald-test asymptomatic p-value.
Statistic tests: Wald test.

Table 3. Family-based Association for total sample for 5-HTTLPR, Transmission Disequilibrium Test Analysis ($p < 0.05$)

	T/U	OR (CI95%)	χ^2	p-value
Anxiety Disorder				
5-HTTLPR Biallelic Genotype	17/15	1.33 (0.57-2.67)	0.125	0.724
5-HTTLPR Triallelic Genotype	18/19	0.95 (0.50-1.80)	0.027	0.869

Abbreviations: 5-HTTLPR, Serotonin Transporter Gene- linked Polymorphic Region; T, Transmitted; U, Untransmitted; OR, Odds Ratio; χ^2 , Chi-squared test.

Table 4. Family-based Association for total sample for 5-HTTLPR, Transmission Disequilibrium Test Analysis ($p < 0.05$)

	β	SE (CI 95%)	p-value
Behavioral Inhibition (n = 100)			
5-HTTLPR Biallelic Genotype	0.049	0.10 (- 0.15-0.25)	0.627
5-HTTLPR Triallelic Genotype	0.101	0.08 (- 0.07-0.27)	0.241
Harm Avoidance (n = 103)			
5-HTTLPR Biallelic Genotype	- 2.01	2.21 (- 6.35-2.33)	0.366
5-HTTLPR Triallelic Genotype	- 1.11	1.78 (- 4.60-2.38)	0.534

Abbreviations: 5-HTTLPR, Serotonin Transporter Gene- linked Polymorphic Region; β , regression coefficient ; SE standard error; CI, confidence interval.

REFERENCES

- Becker K, El-Faddagh M, Schmidt MH, Laucht M. Is the serotonin transporter polymorphism (5-HTTLPR) associated with harm avoidance and internalising problems in childhood and adolescence? *Journal of Neural Transmission* 2007; 114: 395-402.
- Beesdo K, Knappe S, Pine DS. Anxiety and anxiety disorders in children and adolescents: developmental issues and implications for DSM-V. *The Psychiatric clinics of North America* 2009; 32 (3): 483-524.
- Birmaher B, Brent DA, Chiappetta L, Bridge J, Monga S, Baugher M. Psychometric properties of the Screen for Child Anxiety Related Emotional Disorders (SCARED): a replication study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1999; 38(10):1230-6.
- Blaya C, Salum GA, Lima MS, Leistner-Segal S, Manfro GG. Lack of association between the Serotonin Transporter Promoter Polymorphism (5-HTTLPR) and Panic Disorder: a systematic review and meta-analysis. *Behavioral and Brain Functions* 2007; 3 (41): 1-10.
- Blaya C, Salum GA, Moorjani P, Seganfredo AC, Heldt E, Leistner-Segal S et al. Panic disorder and serotonergic genes (SLC6A4 , HTR1A and HTR2A): Association and interaction with childhood trauma and parenting. *Neuroscience Letters* 2010; 485 (1):11-5.
- Burkhouse KL, Gibb BE, Coles ME, Knopik VS, McGueary JE. Serotonin Transporter Genotype Moderates the Link Between Children's Reports of Overprotective Parenting and Their Behavioral Inhibition. *J Abnormal Child Psychol* 2011; 39 (6): 783-90.
- Calapoglu M, Calapoglu NS, Karaçöp A, Soyöz M, Elyıldırım Ü, Avşaroğlu, S. Serotonin Transporter Bi- and Triallelic Genotypes and Their Relationship with Anxiety and Academic Performance: A Preliminary Study. *Neuropsychobiology* 2010; 63:103-11.
- Cloninger CR, Svrakic DM, Przybeck TR. A psychobiological model of temperament and character. *Arch. Gen. Psychiatry* 1993; 50 (12) 975-90.
- Cloninger CR. A systematic method for clinical description and classification of personality variants. A proposal. *Arch Gen Psychiatry* 1987, 44(6):573-88.
- DiLalla L, Kagan J, Reznick J. Genetic etiology of behavioral inhibition among 2-year-old children. *Infant Behav* 1994; 17: 405-12.
- Domschke k, Reif A. Behavioral Genetics of Affective and Anxiety. Disorders. *Clinical Genetics* 2012; 12: 463-512.

Gonçalves DM, Cloninger CR. Validation and normative studies of the Brazilian Portuguese and American versions of the Temperament and Character Inventory - Revised (TCI-R). *J Affect Disord* 2010;124(1-2):126-33.

Greenberg BD, Li, Q, Lucas FR, Hu S, Sirota LA, Benjamin J et al. Association Between the Serotonin Transporter Promoter Polymorphism and Personality Traits in a Primarily Female Population Sample. *American Journal of Medical Genetics* 2000; 96: 202-16.

Gustavsson JP, Nöthen MM, Jönsson EG, Neidt H, Forslund K, Rylander G et al. No Association Between Serotonin Transporter Gene Polymorphisms and Personality Traits. *American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)* 1999; 88: 430-36.

Hettema MJ, Neale MC, Kendler, KS. A Review and Meta-Analysis of the Genetic Epidemiology of Anxiety Disorders. *Psychiatry: Interpersonal and Biological Processes*, 2001;158:1568-78.

Homberg JR, Lesch K-P. Looking on the Bright Side of Serotonin Transporter Gene Variation. *Biological psychiatry* 2010; 21:1-7.

Hopper JL, Bishop DT, Easton DF. Population-based family studies in genetic epidemiology. *The Lancet* 2005; 366 (6):1397-1406.

Hu XZ, Lipsky RH, Zhu G, Akhtar LA, Taubman J, Greenberg BD, et al. Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. *Am J Hum Genet* 2006; 78(5):815-26.

Isolan L, Salum GA, Osowski AT, Amaro E, Manfro GG. Psychometric properties of the Screen for Child Anxiety Related Emotional Disorders (SCARED) in Brazilian children and adolescents. *Journal of Anxiety Disorders* 2011; 25 (5): 741-48.

Jennings KA, Loder MK, Sheward, WJ, Pei, Q, Deacon RMJ, Benson MA et al. Increased Expression of the 5-HT Transporter Confers a Low- Anxiety Phenotype Linked to Decreased 5-HT Transmission. *The Journal of Neuroscience* 2006; 26 (35): 8955- 64.

Joo YH, Oh HB, Kim B, Jung SH, Chung JK, Hong JP et al. No Association between 5-HTTLPR and Harm Avoidance in Korean College Students. *Neuropsychobiology* 2007; 22: 138- 41.

Jorm AF, Henderson AS, Jacomb PA. An association study of a functional polymorphism of the serotonin transporter gene with personality and psychiatric symptoms. *Molecular Psychiatry* 1998; 3: 449-51.

Kagan J, Reznick JS, Snidman N, Gibbons J, Johnson MO. Childhood derivatives of inhibition and lack of inhibition to the unfamiliar. *Child Development* 1988; 59 (6): 1580-9.

Kaufman J, Birmaher B, Brent D, Rao U, Flynn C, Moreci P et al. Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children-Present and Lifetime Version (K-SADS-PL): Initial Reliability and Validity Data. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 1997; 36 (7): 980-88.

Koenen KC, Uddin M, Chang S-C, Aiello AE, Wildman DE, Goldmann E et al. SLC6A4 Methylation modifies the effect of the number of traumatic events on risk for Posttraumatic Stress Disorder. *Depression and Anxiety* 2011; 28 (8): 639-47.

Lang UE, Bajbouj M, Wernicke C, Rommelspacher H, Danker-Hopfe H, Gallinat J. No association of a functional polymorphism in the serotonin transporter gene promotor and anxiety-related personality traits. *Neuropsychobiology* 2004; 49 (4):182-4.

Lau JY, Goldman D, Buzas B, Fromm SJ, Guyer AE, Hodgkinson C et al. Amygdala function and 5-HTT gene variants in adolescent anxiety and major depressive disorder. *Biological psychiatry* 2009; 65 (4): 349-55.

Laucht M, Treutlein J, Blomeyer D, Buchmann AF, Schmid B, Becker K et al. Interaction between the 5-HTTLPR serotonin transporter polymorphism and environmental adversity for mood and anxiety psychopathology: evidence from a high-risk community sample of young adults. *The international journal of Neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)* 2009; 12 (6): 737-47.

Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, petri S et al. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 1996; 274 (5292):1527-31.

Lesch KP. Variation of serotonergic gene expression: neurodevelopment and the complexity of response to psychopharmacologic drugs. *Eur Neuropsychopharmacol* 2001; 11 (6): 457-74.

Manor I, Eisenberg J, Tyano S, Sever Y, Cohen H, Ebstein RP et al. Family-Based Association Study of the Serotonin Transporter Promoter Region Polymorphism (5-HTTLPR) in Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *American Journal of Medical Genetics* 2001; 105 (1): 91-5.

Middeldorp CM, de Geus EJ, Beem AL, Lakenberg N, Hottenga JJ, Slagbomm PE et al. Family based association analyses between the serotonin transporter gene polymorphism (5-HTTLPR) and neuroticism, anxiety and depression. *Behavior Genetics* 2007; 37 (2): 294-301.

Minelli A, Bonvicini C, Scassellati C, Sartori R, Gennarelli M. The influence of psychiatric screening in healthy populations selection: a new study and meta-analysis of functional 5-HTTLPR and rs25531 polymorphisms and anxiety-related personality traits. *BMC Psychiatry* 2011; 11 (50): 1-12.

Munafò MR, Freimer NB, Ng W, Ophoff R, Veijola J, Miettunen J et al . 5-HTTLPR Genotype and Anxiety-Related Personality Traits: A meta-analysis and new data.

American Journal of Medical Genetics Part B Neuropsychiatric Genetics 2009; 150B (2): 271-81.

Narasimhan S, Hodge R, Doyle GA, Kraemer DJ, Prabhakaran R, Rickels K et al. Association analysis between the 5-HTTLPR polymorphism in the SLC6A4 gene and generalized anxiety disorder. *Psychiatric Genetics* 2011; 21 (5): 267-8.

Parsey RV, Hastings RS, Oquendo MA, Hu X, Goldman D, Huang YY et al. Effect of a Triallelic Functional Polymorphism of the Serotonin-Transporter-Linked Promoter Region on Expression of Serotonin Transporter in the Human Brain. *Am J Psychiatry* 2006; 163 (1): 48-51.

Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D et al. PLINK: a toolset for whole genome association and population-based linkage analyses. *Am Journal Human Genetic* 2007; 81 (3): 559-75.

Reznick JS, Hegeman IM, Kaufman ER, Woods SW, Jacobs M. Retrospective and concurrent self-report of behavioral inhibition and their relation to adult mental health, *Dev. Psychopathol* 1992; 4: 301-21.

Rockhill C, Kodish I, DiBattisto C, Macias M, Varley C, Ryan S. Anxiety disorders in children and adolescents. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care* 2010; 40 (4): 66-99.

Salum GA, Isolan LR, Bosa VL, Tocchetto AG, Teche SP, Schuch I et al. The multidimensional evaluation and treatment of anxiety in children and adolescents: rationale, design, methods and preliminary findings Avaliação multidimensional e tratamento da ansiedade em crianças e adolescentes: marcoteórico, desenho, métodos e resultados preliminares. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 2011; 33 (2): 181-95.

Smoller JW, Block SR, Young MM. Genetics of anxiety disorders: the complex road from DSM to DNA. *Depression and anxiety* 2009; 26 (11): 965-75.

Strug LJ, Suresh R, Fyer A, Talati A, Adams PB, Li W et al. Panic Disorder is Associated with the Serotonin Transporter Gene (SLC6A4) But Not the Promoter Region (5-HTTLPR). *Mol Psychiatry* 2010; 15 (2):166-76.

Sullivan PF, Eaves LJ, Kendler KS, Neale MC. Genetic Case-Control Association Studies in Neuropsychiatry. *Archives of general psychiatry* 2001; 58 (11): 1015-24.

Wachleski C, Blaya C, Salum GA, Vargas V, Leistner-Segal S, Manfro GG . Lack of association between the serotonin transporter promoter polymorphism (5-HTTLPR) and personality traits in asymptomatic patients with panic disorder. *Neuroscience Letters* 2008; 431(2): 173-8.

7. DISCUSSÃO

A literatura psiquiátrica tem demonstrado amplo interesse nas investigações envolvendo a associação entre o 5-HTTLPR e os transtornos psiquiátricos, porém, os estudos revelam-se controversos. O influente estudo de Lesch et al. (1996), que encontrou associação do alelo S do 5-HTTLPR e traços relacionados à ansiedade, impulsionou a comunidade científica a investigar os mecanismos neurobiológicos envolvidos no comportamento ansioso (transtorno de ansiedade (TA) e seus endofenótipos).

Alguns estudos encontraram associação entre os TA e o 5-HTTLPR (JENNINGS et al., 2006; CALAPOĞLU et al. 2010), mas outros, apesar da plausibilidade biológica, não replicaram os achados (BLAYA et al., 2007; STRUG et al., 2010). Além disso, alguns trabalhos descrevem uma associação entre o 5-HTTLPR e os traços relacionados à ansiedade, tais como evitação de danos, comportamento inibido e neuroticismo (GREENBERG et al., 2000; OSHER et al., 2000), enquanto outros reportam resultados negativos (FLORY et al., 1999; GUSTAVSSON et al., 1999; LANG et al., 2004; WACHLESKI et al., 2008).

Os estudos envolvendo esse tipo de abordagem estão em recorrente contradição, revelando alta complexidade no seu entendimento. Flory et al. (1999), além de não encontrarem associação entre o 5-HTTLPR bialélico e o neuroticismo (225 caucasianos adultos), reportaram que os homens com o alelo S são menos ansiosos. Em contrapartida, Du et al. (2000) encontraram, em 186 indivíduos saudáveis, uma associação do alelo S do 5-HTTLPR e o neuroticismo, mas somente em homens. O efeito do genótipo no neuroticismo não foi significativo. Os pesquisadores sugerem diferenças de gênero na contribuição dos fenótipos

comportamentais. Eles acreditam que as inconsistências podem ser devido a diferentes proporções de mulheres e homens nos estudos.

Além das inconsistências encontradas em estudos clínicos, há alguns aspectos que são relevantes na busca do entendimento da funcionalidade do 5-HTTLPR.

Os linfoblastos, constitutivamente, expressam transportador de serotonina (5-HTT) funcional similar aos neurônios serotoninérgicos: eles exibem adenosina 3,5-monofosfato cíclico (cAMP)-dependente e proteína quinase C (PKC) dependente da regulação do gene do 5-HTT (LESCH et al., 1996) e são usados para avaliar diferenças em nível transcricional: a presença de um ou dois alelos S do 5-HTTLPR reduziu a expressão do 5-HTT, em 27% e 30%, respectivamente, quando comparado com os homozigotos para o alelo L (HRANILOVIC et al., 2004). No entanto, a expressividade do 5-HTT, em áreas encefálicas, é de interesse no entendimento do polimorfismo funcional 5-HTTLPR.

Willeit et al. (2001) não encontraram, em 16 encéfalos adultos saudáveis, utilizando tomografia computadorizada de emissão de fóton único, qualquer correlação, no mesencéfalo, entre o genótipo 5-HTTLPR e a disponibilidade do 5-HTT. Parsey et al. (2006) compararam um grupo de voluntários saudáveis e um grupo de indivíduos com depressão e avaliaram os efeitos do genótipo trialélico do 5-HTTLPR (L_A, L_G e S) no nível de ligação do 5-HTT em diferentes áreas encefálicas (mesencéfalo, tálamo, hipocampo, putâmen, amígdala e cíngulo anterior). Corroborando com os achados do estudo anterior, eles também não encontraram diferença transcricional entre os grupos de indivíduos e entre as áreas encefálicas estudadas. Shioe et al. (2003) estudaram o encéfalo de 27 sujeitos, através de tomografia por emissão de pósitron (PET), e também não encontraram associação

entre o genótipo do 5-HTTLPR e o 5-HTT ligado no encéfalo. Embora as células de linfoblastos dos sujeitos LL tenham produzido maiores concentrações de RNAm e proteína do 5-HTT em comparação aos indivíduos SL ou SS nos estudos *in vitro*, o 5-HTT ligado *in vivo* não diferenciou, significativamente, entre os diferentes genótipos dos indivíduos (SHIOE et al., 2003).

Outra questão intrigante, e pouco explorada devido a sua complexidade, é a relacionada à hipótese dos estudos de associação entre o alelo S do 5-HTTLPR e os TA e seus endofenótipos. Os autores buscam discutir os achados reportados na literatura de acordo com os níveis de evidência, entretanto pouco ainda se sabe sobre o significado destas associações. Nordquist & Orelan (2010) tentam explicar o porquê de uma variante que aumenta os níveis de serotonina (5-HT) disponíveis na fenda sináptica, como é o caso do alelo S do 5-HTTLPR, ser associada, em alguns estudos, a transtornos psiquiátricos. Eles acreditam que o *feedback* negativo da 5-HT (redução da produção da 5-HT pelo aumento dos níveis na fenda sináptica), nos neurônios serotoninérgicos, seja dependente do autoreceptor 5-HT_{1A} expresso, durante o desenvolvimento inicial encefálico, tanto em neurônios serotoninérgicos quanto em regiões-alvo do sistema límbico. Os diferentes níveis de 5-HT, no período embrionário, poderiam ter consequências na neurocircuitaria, no tamanho e na capacidade do próprio sistema serotoninérgico. Eles acreditam que as consequências fenotípicas da modulação dos níveis de 5-HT no encéfalo adulto sejam decorrência de um encéfalo já “consolidado” durante o desenvolvimento embrionário (NORDQUIST; ORELAND, 2010).

Estudos com animais demonstram que a separação maternal no início da vida (modelo para o estresse) pode afetar a neurotransmissão serotoninérgica por causar diferenças de expressão nos receptores de 5-HT e no 5-HTT (ORELAND et

al., 2009). Assim, pode-se inferir que, em casos em que o indivíduo é exposto ao estresse no início da vida (interação Gene x Ambiente), os seus receptores para a 5-HT poderiam estar com a funcionalidade diminuída. Dessa forma, haveria mais 5-HT na fenda sináptica e, com isso, uma menor indução na produção desse neurotransmissor. Somados a esse resultado, os indivíduos carreadores do alelo S teriam mais prejuízo porque a produção do neurotransmissor seria menor ainda, já que essa variante do 5-HTTLPR confere uma baixa funcionalidade do transportador de 5-HT.

Com o auxílio de camundongos *Knock-in SERT^{CRE}*, que permitem visualizar todas as células que expressam 5-HTT em qualquer ponto durante o período da vida, os pesquisadores mapearam diversas regiões que podem ser alvos dos ISRS, amplamente utilizados na clínica. Eles caracterizaram os sítios de expressão do 5-HTT em áreas encefálicas como córtex pré-frontal, córtex cingulado e hipocampo (NARBOUX-NÊME et al., 2008). Apesar da influência conhecida do 5-HTTLPR em áreas límbicas (HARIRI et al., 2002; FURMARK et al., 2004), Viviani et al. (2011) não encontraram efeito do genótipo do 5-HTTLPR, em 183 adultos saudáveis, nos níveis de perfusão basais observados na amígdala, córtex órbito-frontal ou avaliação global encefálica. Esses são apenas exemplos da difícil compreensão que envolve as tentativas de elucidar os mecanismos neurobiológicos subjacentes às manifestações fenotípicas envolvendo os TA e seus endofenótipos.

Estudos longitudinais podem fornecer informações acerca do desenvolvimento de sintomas ansiosos ao longo do tempo ou a predição dos mesmos. Petersen et al. (2012) investigaram, em 574 adolescentes (12-17 anos), a interação entre o genótipo do 5-HTTLPR trialélico e eventos estressores (ex.: morte, divórcio dos pais, problemas financeiros na família) no desenvolvimento de sintomas

ansiosos e depressivos. Os resultados indicam que os indivíduos com os genótipos SS, L_GS ou L_GL_G, e que apresentam mais eventos estressantes, possuem mais sintomas ansiosos ou depressivos em relação àqueles que possuem alta transcrição do 5-HTT (L_AL_A) e com menos experiências estressantes. O interessante é que essa interação G x A foi significativa aos 16 e 17 anos de idade e não nos períodos anteriores da adolescência. Para os pesquisadores, a teoria da maturação tardia do córtex pré-frontal (PFC) poderia tentar explicar a vulnerabilidade para efeitos estressores no período final da adolescência (ANDERSEN et al., 2008). Como o PFC modula a atividade de áreas límbicas, incluindo a amígdala, envolvida no processamento da emoção e do medo, há a sugestão de que a depressão ou a ansiedade dos adolescentes poderia resultar do desenvolvimento tardio do PFC. Este estudo, assim como outros (LAUCHT et al., 2009; BURKHOUSE et al., 2011; PLUESS et al., 2011) chamam a atenção para o estudo das interações Gene x Ambiente, envolvendo o 5-HTTLPR e os transtornos e endofenótipos associados à ansiedade.

Kaufman et al. (2006) estudaram os efeitos de interação Gene x Ambiente x Gene em uma amostra de 196 crianças: 109 crianças que foram removidas da presença de seus pais, por abuso ou negligência, e 87 controles que nunca tiveram histórico de maus-tratos ou exposição à violência familiar. A intenção dos pesquisadores foi avaliar a interação entre o 5-HTTLPR, com a classificação bialélica, e o polimorfismo Val66Met do BDNF e o histórico de maus-tratos infantil na predição de sintomas depressivos. A presença do alelo Met do BDNF e de dois alelos S para o 5-HTTLPR foi associada com os mais altos escores de depressão, mas somente em crianças maltratadas. Os indivíduos do grupo controle com esses dois genótipos não elevaram seus escores de depressão. Nesse contexto, os

achados poderiam ser semelhantes na predição dos TA, já que há comorbidade entre ansiedade e depressão (ROCKHILL et al., 2010).

Wiggins et al. (2012) avaliaram a influência do 5-HTTLPR, em 39 crianças e adolescentes (8-19 anos), na conectividade da rede neural no estado de repouso. Os pesquisadores utilizaram IRMf e relataram que indivíduos SS do 5-HTTLPR possuem conectividade mais fraca no córtex frontal medial superior direito em relação aos outros genótipos. Eles constataram que as diferenças genotípicas são mais pronunciadas com o aumento da idade. Os achados do trabalho de Wiggins et al. (2012) sugerem que as alterações no padrão da atividade encefálica, relacionadas ao 5-HTTLPR, podem ser ubíquas e não manifestadas, somente, em situações específicas como, por exemplo, uma apresentação de estímulo emocional.

O presente trabalho apresenta alguns pontos fortes que deveriam ser apontados. Ao contrário de muitos trabalhos, optamos por utilizar a classificação trialélica do 5-HTTLPR, além da bialélica, o que permite uma análise mais aprofundada em nível funcional desse polimorfismo. Agrupando, devidamente, os genótipos pelo nível de expressividade (baixo: SS, L_GL_G, L_GS; intermediário: L_AS, L_AL_G e alto: L_AL_A) (PARSEY et al., 2006), minimizamos a possibilidade de associações espúrias. Grande parte dos estudos, disponíveis na literatura, não considera o SNP rs25531 (classificação trialélica) e, portanto, agrupam alelos L_G e L_A como se possuíssem o mesmo nível transcricional, o que não é o ideal.

Há poucos estudos envolvendo amostra comunitária e, principalmente, da faixa etária que contempla esse estudo (10- 17 anos de idade) avaliando a presença de TA e seus endofenótipos e uma associação com o 5-HTTLPR. Além disso, nossa amostra foi composta de indivíduos muito bem selecionados e avaliados para casos e controles em relação aos TA. As escalas utilizadas para avaliar os fenótipos de

ansiedade estão validadas para a população brasileira conferindo confiabilidade nas medidas psicométricas. Também, o comportamento inibido e a evitação de danos não são explorados, em análises sobre os traços relacionados à ansiedade e o 5-HTTLPR, com a mesma frequência do neuroticismo.

O estudo envolvendo dois desenhos distintos: caso controle e estudo de trios também representa um diferencial, pois diminui a interferência da estratificação populacional que é um problema metodológico dos estudos de genética molecular. Este cuidado é de extrema importância em estudos de genética psiquiátrica, uma vez que a frequência alélica de polimorfismos varia em diferentes populações. Em estudos comparativos, por exemplo, a população asiática apresentou uma frequência alélica elevada (81%) para o alelo S, ao contrário dos caucasianos (43%) (MURAKAMI et al., 1999). Esta é uma questão metodológica que deve ser considerada na discussão de achados controversos na literatura.

Como os transtornos psiquiátricos são complexos e, provavelmente, influenciados tanto por uma variedade de polimorfismos do mesmo gene, quanto de outros genes, além de fatores ambientais, a associação de um único ou poucos polimorfismos genéticos nesses transtornos, apesar de frequentemente estudada, exige novos questionamentos. A estrutura genética dos endofenótipos avaliados é poligênica por natureza, ou seja, vários genes contribuem de maneiras diferentes para as diferenças individuais de dimensões específicas de comportamento inibido e evitação de danos. Assim, estudos com interações (Gene x Ambiente; Gene x Gene, entre outros) são importantes nesse contexto. Nosso grupo de pesquisa entende que a ampliação do campo da biologia molecular e genética é essencial e, atualmente, já estamos trabalhando com mais 10 polimorfismos (SNPs) em 6 genes, na mesma amostra do estudo. Os genes são: gene da proteína 5 ligada à FK506

(FKBP5); gene dos receptores de mineralocorticoide (NR3C2 e NR3C1); gene do receptor 1 do hormônio liberador de corticotropina (CRHR1); gene do receptor 1B da vasopressina-arginina (AVPR1B) e gene da globulina ligada à corticosteróide (SERPINA 6).

Mecanismos epigenéticos complexos regulam a atividade do gene, sem alteração da sequência do DNA, produzindo alterações transcricionais (expressão do gene) essenciais ao desenvolvimento, diferenciação celular e adaptação às mudanças ambientais. Esses mecanismos que incluem metilação do DNA, modificações covalentes pós-translacionais de histonas, “deslizamentos” de nucleossomos e substituições de nucleossomos e histonas, causam modificações na conformação da cromatina, envolvida na expressão do gene (BY PARK et al., 2011; KUBOTA et al., 2012). Assim, contribuições epigenéticas também são de interesse em futuros estudos do nosso grupo de pesquisa. A avaliação dos padrões de metilação poderá ampliar o nosso conhecimento sobre os TA.

Esperamos aprofundar nossas análises genéticas a fim de melhor compreendermos a etiologia dos TA e seus endofenótipos. Acreditamos que o nosso trabalho cumpriu, apesar do tamanho amostral relativamente pequeno, a tarefa de buscar essa compreensão utilizando metodologias combinadas de delineamento e análises estatísticas robustas em uma amostra bem selecionada e avaliada, além de ter utilizado a classificação trialélica do 5-HTTLPR.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo explora a relação entre um polimorfismo funcional na região promotora do gene do transportador de serotonina (5-HTTLPR), extremamente relevante do ponto de vista neurobiológico, e os TA, comportamento inibido e evitação de danos em uma amostra de adolescentes e seus familiares.

Nosso estudo reporta a ausência de associação entre os genótipos bialélico e trialélico do 5-HTTLPR e os TA, comportamento inibido e evitação de danos tanto em uma abordagem caso-controle quanto em estudo de trios. Os estudos que buscam associação entre o 5-HTTLPR e essas variantes são muito controversos tanto em seus resultados quanto em suas metodologias, necessitando novas investigações, principalmente com estudos de meta-análises. Nossos achados estão de acordo com a maioria dos estudos da literatura publicada e meta-análises.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMPOLLINI, P. et al. Temperament and personality features in patients with major depression, panic disorder and mixed conditions. **J Affect Disord**, v. 52, p.203-207, 1999.

ANDERSEN et al. Preliminary Evidence for Sensitive Periods in the Effect of Childhood Sexual Abuse on Regional Brain Development. **Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 20, p. 292–301, 2008.

ARIAS, B.; AGUILERA, M.; MOYA, J.; et al. The role of genetic variability in the SLC6A4, BDNF and GABRA6 genes in anxiety-related traits. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, p. 1-9, 2011.

BARLOW, D.H.; CHORPITA, B.F.; TUROVSKY, J. Fear, panic, anxiety, and disorders of emotion. **Nebr Symp Motiv**, v. 43, p. 251-328, 1996.

BATTAGLIA et al. Influence of the Serotonin Transporter Promoter Gene and Shyness on Children's Cerebral Responses to Facial Expressions. **Arch Gen Psychiatry**, v. 62, p. 85-94, 2005.

BECKER, K.; SCHMIDT, M.H.; LAUCHT, M. Is the serotonin transporter polymorphism (5-HTTLPR) associated with harm avoidance and internalising problems in childhood and adolescence? **Journal of Neural Transmission**, p. 395-402, 2007.

BEESDO, K.; KNAPPE, S.; PINE, D.S. Anxiety and anxiety disorders in children and adolescents: developmental issues and implications for DSM-V. **The Psychiatric clinics of North America**, v. 32, n. 3, p. 483-524, 2009.

BERNSTEIN, B.E.; MEISSNER, A.; LANDER, E.S. The Mammalian Epigenome. **Cell**, v. 4, n. Figure 1, p. 669-681, 2007.

BIEDERMAN, J.; HIRSHFELD-BECKER, ROSENBAUM, J.F. et al. Further Evidence of Association Between Behavioral Inhibition and Social Anxiety in Children. **Psychiatry: Interpersonal and Biological Processes**, v. 158, p. 1673-1679, 2001.

BLAYA, C.; SALUM, G.A; LIMA, M.S.; LEISTNER-, S.; MANFRO, GISELE G. Lack of association between the Serotonin Transporter Promoter Polymorphism (5-HTTLPR) and Panic Disorder: a systematic review and meta-analysis. **Behavioral and Brain Functions**, v. 10, p. 1-10, 2007.

BRANDES, M.; BIENVENU, O.J. Personality and anxiety disorders. **Curr Psychiatry Rep**, v. 8, n.4, p.263-269, 2006.

BRODIE, B.B.; SHORE, P.A. A concept for a role of serotonin and norepinephrine as chemical mediators in the brain. **Annals New York academy of Sciences**, p. 631-642, 1957.

BRYANT, R.A; FELMINGHAM, K.L.; FALCONER, E.M.; et al. Preliminary evidence of the short allele of the serotonin transporter gene predicting poor response to cognitive behavior therapy in posttraumatic stress disorder. **Biological psychiatry**, v. 67, n. 12, p. 1217-1219, 2010.

BURKHOUSE, K.L.; GIBB, B.E.; E.COLES, M.; KNOPIK, V.S.; MCGEARY, J.E. Serotonin Transporter Genotype Moderates the Link Between Children's Reports of Overprotective Parenting and Their Behavioral Inhibition. **J Abnormal Child Psychol**, v. 39, n. 6, p. 783-790, 2011.

BY PARK, et al. Epigenetic Changes of Serotonin Transporter in the Patients with Alcohol Dependence: Methylation of an Serotonin Transporter Promoter CpG Island, **Psychiatry Investig**, v. 8, p. 130-133, 2011.

CALAPOĞLU, M. et al. Serotonin Transporter Bi- and Triallelic Genotypes and Their Relationship with Anxiety and Academic Performance: A Preliminary Study. **Neuropsychobiology**, v. 63, n. 2, p. 103-111, 2010.

CANLI, T.; LESCH, K.-PETER. Long story short: the serotonin transporter in emotion regulation and social cognition. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 9, p. 1103-1109, 2007.

CASPI, A.; SUGDEN, K.; MOFFITT, T.E.; et al. Influence of Life Stress on Depression: Moderation by a Polymorphism in the 5-HTT Gene. **Science (New York, N.Y.)**, v. 301, n. 5631, p. 386-9, 2003.

CERRITO, F.; RAITERI, M. Serotonin release is modulated by pre- synaptic autoreceptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 57, p. 427– 430, 1979.

CLONINGER, C.R. A systematic method for clinical description and classification of personality variants. A proposal. **Arch Gen Psychiatry**, v. 44, n.6, p.573-88, 1987.

CLONINGER, C.R.; SVRAKIC, D.M.; PRZYBECK, T.R. A psychobiological model of temperament and character. **Arch Gen Psychiatry**, V.50, P.975-90, 1993.

COSTELLO, E. J.; MUSTILLO, S.; ERKANLI, A.; KEELER, G.; ANGOLD, A. Prevalence and development of psychiatric disorders in childhood and adolescence. **Archives of general psychiatry**, v. 60, n. 8, p. 837-44, 2003.

DAHLSTROM, A.; FUXE, K. Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 62, p. 1-55, 1964.

DEFRANCESCO, M.; NIEDERSTATTER, H.; PARSON, W.; et al. Influence of Serotonin Transporter Genotype and Catechol-O-Methyltransferase Val158Met Polymorphism on Recognition of Emotional Faces. **Journal of the International Neuropsychological Society**, v. 17, p. 1014-1020, 2011.

DELBRÜCK, S.; WENDEL, B.; GRUNEWALD, I.; et al. A novel allelic variant of the human serotonin transporter gene regulatory polymorphism. **Cytogenet Cell Genetic**, v. 79, p. 214-220, 1997.

DONNER, J.; PIRKOLA, S.; SILANDER, K.; et al. An Association Analysis of Murine Anxiety Genes in Humans Implicates Novel Candidate Genes for Anxiety Disorders. **Biological Psychiatry**, v. 64, p. 672-680, 2008.

DU L.; BAKISH, D.; HRDINA P.D. Gender differences in association between serotonin transporter gene polymorphism and personality traits, **Psychiatr Genet**, v. 10, n 4, p. 159-164, 2000.

EAVES, L.; EYSENCK, H. The nature of extraversion: a genetical analysis. **J Pers SocPsychol**, v. 32, p.102-112, 1975.

EGGER, H.L.; ANGOLD, A. Common emotional and behavioral disorders in preschool children: presentation, nosology, and epidemiology. **Journal of Child Psychology And Psychiatry**, v. 4, p. 313-337, 2006.

EHLI, E.A.; HU, Y.; HUDZIAK, J.J.; DAVIES, G.E. Identification and functional characterization of three novel alleles for the serotonin transporter-linked polymorphic region. **Molecular Psychiatry**, p. 1-8, 2011.

EVANS, J.; XU, K.; HERON, J.; et al. Emotional Symptoms in Children: The Effect of Maternal Depression, Life Events, and COMT Genotype. **American Journal Of Medical Genetics Part B Neuropsychiatric Genetics**, v. 150B, n. 2, p. 209-218, 2009.

EYSENCK, H.J.; EYSENCY, M. Personality and individual differences: A natural science. **New York: Plenum Press**, 1985.

FLEITLICH-BILYK, B.; GOODMAN, R. Prevalence of child and adolescent psychiatric disorders in southeast Brazil. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**, v. 43, n.6, p. 727-734, 2004.

FLORY, J.D. et al. Neuroticism is not associated with the serotonin transporter (5-HTTLPR) polymorphism, **Mol Psychiatry**, v. 4, n 1, p. 93-96, 1999.

FOX, E.; RIDGEWELL, A.; ASHWIN, C. Looking on the bright side: biased attention and the human serotonin transporter gene. **Proceedings of The Royal Society B**, v. 276, p. 1747-1751, 2009.

FRICK, P.J.; MORRIS, A.S. Temperament and developmental pathways to conduct problems. **J Clin Child Adolesc Psychol**, v. 33, p. 54-68, 2004.

FURMARK, T.; TILLFORS, M.; GARPENSTRAND, H.; et al. Serotonin transporter polymorphism related to amygdala excitability and symptom severity in patients with social phobia. **Psychological Assessment**, v. 362, p. 189-192, 2004.

GELERNTER, J.; PAKSTIS, A.J.; KIDD, K.K. Linkage mapping of serotonin transporter protein gene SLC6A4 on chromosome 17. **Human Genetic**, 95: 677-680, 1995.

GOLDBERG, L.R. The structure of phenotypic personality traits. **American Psychologist**, v.48, p. 26-34, 1993.

GOTTESMAN, I.I.; GOULD, T.D. The Endophenotype Concept in Psychiatry: Etymology and Strategic Intentions. **Am J Psychiatry**, v.160, p. 636-645, 2003.

GRABE, J.H.; SCHWAHN, C.; MAHLER, J.; et al. Genetic epistasis between the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and the 5-HTT promoter polymorphism moderates the susceptibility to depressive disorders after childhood abuse. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, p. 1-7, 2011.

GREENBERG, B.D; LI, Q.; LUCAS, F.R.; et al. Association Between the Serotonin Transporter Promoter Polymorphism and Personality Traits in a Primarily Female Population Sample. **American Journal of Medical Genetics**, v. 96, p. 202-216, 2000.

GUSTAVSSON, J. P.; NÖTHEN, M.M.; JÖNSSON, E.G.; et al. No Association Between Serotonin Transporter Gene Polymorphisms and Personality Traits. **American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)**, v. 88, p. 430-436, 1999.

HADDLEY, K.; BUBB, V.J.; BREEN, G.; QUINN, J.P. Behavioural Genetics of the Serotonin Transporter. **Curr Topics Behav Neurosci**, 2012.

HARIRI, A et al. Serotonin Transporter Genetic Variation and the Response of the Human Amygdala. **Science**, v. 29, p. 400-403, 2002.

HEILS, A. et al. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. **J Neurochem**, v. 66, n. 6, p. 2621-2624, Jun 1996.

HEIMING, R.S.; JENSEN, F.; LEWEJOHANN, L.; et al. Living in a dangerous world : the shaping of behavioral profile by early environment and 5-HTT genotype. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 3, n. 26, p. 1-11, 2009.

HEIMING, R.S.; SACHSER, N. Consequences of serotonin transporter genotype and early adversity on behavioral profile – pathology or adaptation ? **Neuroscience**, v. 4, n. 187, p. 1-10, 2010.

HETTEMA, M.J.; NEALE, M.C.; KENDLER, K.S. A Review and Meta-Analysis of the Genetic Epidemiology of Anxiety Disorders. **Psychiatry: Interpersonal and Biological Processes**, v. 158, p. 1568-1578, 2001.

HIRSHFELD, D.R. et al. Stable behavioral inhibition and its association with anxiety disorder. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**, v. 31, p. 103-111, 1992.

HIRSHFELD-BECKER, D.R.; BIEDERMAN, J. Rationale and Principles for Early Intervention With Young Children at Risk for Anxiety Disorders. **Psychology**, v. 5, n. 3, p. 161-172, 2002.

HOMBERG, J.R.; LESCH, K.-P. Looking on the Bright Side of Serotonin Transporter Gene Variation. **Biological psychiatry**, v. 21, p. 1-7, 2010.

HRANILOVIC, D.; STEFULJ, J.; SCHWAB, S.; et al. Serotonin Transporter Promoter and Intron 2 Polymorphisms: Relationship Between Allelic Variants and Gene Expression. **Gene Expression**, v. 55, p. 1090-1094, 2004.

HU, X.-Z.; LIPSKY, R.H.; ZHU, G.; et al. Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. **American Journal of Human Genetics**, v. 78, n. 5, p. 815-26, 2006.

HUDSON, J.L; RAPEE, R.M. Parent-child interactions in clinically anxious children and their siblings. **J Clin Child Adolesc Psychol**, v. 31, n. 4, p. 548-555, 2002.

ISOLAN, L.R.; ZENI, C.P.; MEZZOMO, K.; et al. Behavioral inhibition and history of childhood anxiety disorders in Brazilian adult patients with panic disorder and social anxiety disorder. **Comportamento inibido e história de transtornos de ansiedade na infância em pacientes brasileiros adultos com transtorno do pânico e transtornos de ansiedade social. Rev Bras Psiquiatr.**, v. 27, n. 2, p. 97-100, 2005.

JANG, K.L.; HU, S.; LIVESLEY, W.J.; et al. Covariance Structure of Neuroticism and Agreeableness : A Twin and Molecular Genetic Analysis of the Role of the Serotonin Transporter Gene. **Journal of Personality and Social psychology**, v. 81, n. 2, p. 295-304, 2001.

JENNINGS, K.A.; LODER, M.K.; SHEWARD, W.J.; et al. Increased Expression of the 5-HT Transporter Confers a Low- Anxiety Phenotype Linked to Decreased 5-HT Transmission. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 35, p. 8955-8964, 2006.

JOO, Y.H.; OH, H.B.; KIM, B.; et al. No Association between 5-HTTLPR and Harm Avoidance in Korean College Students. **Neuropsychobiology**, , n. 18, p. 138-141, 2007.

JORM, A.F.; HENDERSON, A.S.; JACOMB, P.A. An association study of a functional polymorphism of the serotonin transporter gene with personality and psychiatric symptoms. **Molecular Psychiatry**, v. 3, p. 449-451, 1998.

KAGAN, J.; REZNICK, J.S.; SNIDMAN, C.C.; et al. Behavioral inhibition to the unfamiliar. **Child Development**, v. 55, p. 2212-2225, 1984.

KAGAN, J.; et al. TEMPERAMENTAL CONTRIBUTIONS TO THE AFFECT FAMILY OF ANXIETY. **Social Anxiety Disorder**, v. 24, n. 47077, p. 677-688, 2001.

KAUFMAN, J.; YANG, B.-ZHU; DOUGLAS-PALUMBERI, H.; et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor – 5-HTTLPR Gene Interactions and Environmental Modifiers of Depression in Children. **Biological Psychiatry**, v. 59, p. 673-680, 2006.

KELLER, M.; LAVORI, P.; WUNDER, J.; et al. Chronic course of anxiety disorders in children and adolescents. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**, v.31, p. 595-599, 1992.

KENDLER et al. Depression and generalized anxiety disorder: Same genes, (partly) different environments? **Archives of General Psychiatry**, v. 49, p. 716-722, 1992.

KENDLER, K.S. "A Gene for ...": The Nature of Gene Action in Psychiatric Disorders. **American Journal Psychiatry**, v. 162, p. 1243-1252, 2005.

KOENEN, K.C; UDDIN, M.; et al. SLC6A4 Methylation modifies the effect of the number of traumatic events on risk for Posttraumatic Stress Disorder. **Depression and Anxiety**, v. 9, p. 1-9, 2011.

KUBOTA, T.; MIYAKE, K.; HIRASAW, T. Epigenetic understanding of gene-environment interactions in psychiatric disorders: a new concept of clinical genetics, **Clinical Epigenetics**, v.4, p. 1-8, 2012.

LANG, U.E. et al. No association of a functional polymorphism in the serotonin transporter gene promotor and anxiety-related personality traits. **Neuropsychobiology**. v. 49, p. 182–184, 2004.

LAU, J.Y.F.; PINE, D.S. Elucidating risk mechanisms of gene-environment interactions on pediatric anxiety: integrating findings from neuroscience. **European archives of psychiatry and clinical neuroscience**, v. 258, n. 2, p. 97-106, 2008.

LAU, J.Y.F.; GOLDMAN, D.; BUZAS, B. et al. Amygdala function and 5-HTT gene variants in adolescent anxiety and major depressive disorder. **Biological psychiatry**, v. 65, n. 4, p. 349-55, 15 fev 2009.

LAUCHT, M.; TREUTLEIN, J.; BLOMEYER, D.; et al. Interaction between the 5-HTTLPR serotonin transporter polymorphism and environmental adversity for mood and anxiety psychopathology: evidence from a high-risk community sample of young adults. **The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)**, v. 12, n. 6, p. 737-47, 2009.

LEE, M.; BAILER, U.F.; FRANK, G.K. et al. Relationship of a 5-HT transporter functional to 5-HT_{1A} receptor binding in healthy women. **Molecular Psychiatry**, v. 10, p. 715-716, 2005.

LESCH, K.P.; BALLING, U.; GROSS, J. et al. Organization of the human serotonin transporter gene. **J. Neural Transm. Gen**, v. 95, p.157-162, 1994.

LESCH, K.P. et al. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. **Science**, v. 274, n. 5292, p. 1527-1531, Nov 1996.

LESCH, K.P. Variation of serotonergic gene expression: neurodevelopment and the complexity of response to psychopharmacologic drugs. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 11, n. 6, p. 457-474, 2001.

MARCH, J.S. (Edit.). Anxiety disorders in children and adolescents. **New York: Guilford Press**, 2^{ed.}, p. 212-234, 1995.

MARTINOWICH, K.; LU, B. Interaction between BDNF and Serotonin: Role in Mood Disorders. **Neuropsychopharmacology**, p. 73-83, 2008.

MASI et al. Temperament in adolescents with anxiety and depressive disorders and in their families. **Child Psychiatry Hum Dev**, v. 33, p. 245-259, 2003.

MATTSON, M.P.; MAUDSLEY, S.; MARTIN, B. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. **Trends in Neurosciences**, v. 27, n. 10, p. 589-594, 2004.

MCISAAC, W.M.; PAGE, I.H. The Metabolism of Serotonin (5-Hydroxytryptamine). **Metabolism Clinical And Experimental**, v. 234, n. 8, p. 858-864, 1958.

MCLAUGHLIN, D.P.; LITTLE, K.Y.; LÓPEZ, J.F.; WATSON, S.J. Expression of Serotonin Transporter mRNA in Human Brainstem Raphe Nuclei. **Neuropsychopharmacology**, v. 15, n. 5, p. 523-529, 1996.

MIDDELDORP, C.M.; GEUS, E.J.C. DE; BEEM, A.L. et al. Family based association analyses between the serotonin transporter gene polymorphism (5-HTTLPR) and neuroticism, anxiety and depression. **Behavior Genetics**, v. 37, n. 2, p. 294-301, mar 2007.

MINELLI, A.; BONVICINI, C.; SCASSELLATI, C.; SARTORI, R.; GENNARELLI, M. The influence of psychiatric screening in healthy populations selection: a new study and meta- analysis of functional 5-HTTLPR and rs25531 polymorphisms and anxiety-related personality traits. **BMC Psychiatry**, v. 11, n. 1, p. 50, 2011.

MOHAMMAD-ZADEH, L.F.; MOSES, L.; GWALTNEY-BRANT, S.M. Serotonin: a review. **J. vet. Pharmacol. Therap.**, v. 31, n. 1957, p. 187-199, 2008.

MUNAFÒ, M.; CLARK, T.; FLINT, J. Does measurement instrument moderate the association between the serotonin transporter gene and anxiety-related personality traits? A meta-analysis. **Molecular Psychiatry**, v. 10, p. 415-419, 2005.

MUNAFÒ, M.R.; BROWN, S.M.; HARIRI, A.R. Serotonin Transporter (5-HTTLPR) Genotype and Amygdala Activation: A Meta-Analysis. **Experimental Psychology**, v. 63, p. 852-857, 2008.

MUNAFÒ, M.R.; FREIMER, N.B.; NG, W.; et al. 5-HTTLPR Genotype and Anxiety-Related Personality Traits: A meta-analysis and new data. **American Journal of Medical Genetics Part B Neuropsychiatric Genetics**, v. 150B, n. 2, p. 1 -18, 2009.

MURAKAMI, F. et al. Anxiety traits associated with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region in the Japanese, **J. Hum. Genet**, v. 44, p. 15-17, 1999.

MURPHY, D.L.; LERNER, A.; RUDNICK, G.; LESCH, K.-P. Serotonin Transporter : Gene, Genetic Disorders, and Pharmacogenetics. **Review Literature And Arts Of The Americas**, v. 4, n. 2, p. 109-123, 2004.

NAKAMURA, M.; UENO, S.; SANO, A; TANABE, H. The human serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) shows ten novel allelic variants. **Molecular psychiatry**, v. 5, n. 1, p. 32-8, 2000.

NARBOUX-NÊME, N.; PAVONE, L.M.; AVALLONE, L.; ZHUANG, X.; GASPAR, P. Serotonin transporter transgenic (SERT cre) mouse line reveals developmental targets of serotonin specific reuptake inhibitors (SSRIs). **Neuropharmacology**, v. 55, p. 994-1005, 2008.

NEMEROFF, C.B.; OWENS, M.J. The Role of Serotonin in the Pathophysiology of Depression : As Important As Ever. **Clinical Chemistry**, v. 1579, p. 1578-1579, 2009.

NI, W.; WATTS, S.W. 5-hydroxytryptamine in the Cardiovascular System: Focus on the Serotonin Transporter. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, n. 7, p. 575 - 583, 2006.

NORDQUIST, N.; ORELAND, L. Serotonin, genetic variability, behaviour, and psychiatric disorders- a review. **Uppsala journal of Medical Sciences**, v. 115, n. 1, p. 2-10, 2010.

OGILVIE, A.D.; BATTERSBY, S.; BUBB, V.J. et al. Polymorphism in serotonin transporter gene associated with susceptibility to major depression. **Lancet**, v. 347, n. 9003, p. 731-733, 1996.

ORELAND, S.; PICKERING, C.; GÖKTURK, C.; et al. Two repeated maternal separation procedures differentially affect brain 5-hydroxytryptamine transporter and receptors in young and adult male and female rats. **Brain Research**, v. 1305, p. S37-S49, 2009.

OSHER, Y.; HAMER, D.; BENJAMIN, J. Association and linkage of anxiety-related traits with a functional polymorphism of the serotonin transporter gene regulatory region in Israeli sibling pairs. **Mol. Psychiatry**, v. 5, n 2, p. 216-219, 2000.

OWENS, M.J. Molecular and cellular mechanisms of antidepressant drugs. **Depression and Anxiety**, v. 4, p. 153–159, 1996.

OWENS, M.J.; NEMEROFF, C.B. The serotonin transporter and depression. **Depression and Anxiety**, v. 8 (Suppl. 1), p. 5-12, 1998.

PARSEY, R.V.; HASTINGS, R.S.; OQUENDO, M.A.; et al. Effect of a Triallelic Functional Polymorphism of the Serotonin-Transporter-Linked Promoter Region on Expression of Serotonin Transporter in the Human Brain. **Am J Psychiatry**, v. 163, p. 48-51, 2006.

PAHL, K.M.; BARRETT, P.M.; GULLO, M.J. Examining potential risk factors for anxiety in early childhood. **Journal of Anxiety Disorders**, v. 26, n. 2, p. 311-320, 2012.

PÉREZ-EDGAR, K.; FOX, N.A. Temperament and Anxiety Disorders. **Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America**, v. 14, p. 681-706, 2005.

PÉREZ-EDGAR, K.; BAR-HAIM, Y.; MCDERMOTT, J.M.; et al. Variations in the serotonin-transporter gene are associated with attention bias patterns to positive and negative emotion faces. **Biological psychology**, v. 83, n. 3, p. 269-271, 2010.

PERGAMIN-HIGHT, L.; BAKERMANS-KRANENBURG, M.J.; IJZENDOORN, M.H. V.; BAR-HAIM, Y. Variations in the Promoter Region of the Serotonin Transporter Gene and Biased Attention for Emotional Information: A Meta-Analysis. **Biol Psychiatry**, p. 1-7, 2011.

PEROUTKA, S.; HOWELL, T. The molecular evolution of G protein-coupled receptors. **Neuropharmacology**, v. 33, p. 319–324, 1994.

PETERSEN et al. Interaction Between Serotonin Transporter Polymorphism (5-HTTLPR) and Stressful Life Events in Adolescents' Trajectories of Anxious/Depressed Symptoms. **Developmental Psychology**, p. 1-13, 2012.

PEZAWAS, LUKAS; MEYER-LINDENBERG, A.; DRABANT, E. M.; et al. 5-HTTLPR polymorphism impacts human cingulate-amygdala interactions: a genetic susceptibility mechanism for depression. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 6, p. 828-834, 2005.

PINE, D.S.; COHEN, P.; GURLEY, D.; BROOK, J.; MA, Y. The Risk for Early-Adulthood Anxiety and Depressive Disorders in Adolescents With Anxiety and Depressive Disorders. **ARCH GEN PSYCHIATRY**, v. 55, p. 56-64, 1998.

PLUESS, M.; VELDERS, F.P.; BELSKY, J.; et al. Serotonin Transporter Polymorphism Moderates Effects of Prenatal Maternal Anxiety on Infant Negative Emotionality. **Biol Psychiatry**, v. 69, n. 6, p. 520-525, 2011.

POLANCZYK, G.V. Em busca das origens desenvolvimentais dos transtornos mentais Searching for the developmental origins of mental disorders. **Rev Psiquiatr RS**, v. 31, n. 1, p. 6-12, 2009.

RASMUSSEN, H.B.; WERGE, T.M. Novel procedure for genotyping of the human serotonin transporter gene-linked polymorphic region (5-HTTLPR) – a region with a high level of allele diversity. **Psychiatric Genetics**, p. 287-291, 2007.

REID, G.; RAND, M. Pharmacological actions of synthetic 5- hydroxytryptamine. **Nature**, v.169, p. 801-802, 1952.

ROCKHILL, C.; KODISH, I.; DIBATTISTO, C.; et al. Anxiety disorders in children and adolescents. **Current problems in pediatric and adolescent health care**, v. 40, n. 4, p. 66-99, 2010.

ROTHBART, M.K. Differentiated measures of temperament and multiple pathways to childhood disorders. **J Clin Child Adolesc Psychol**, v. 33, p. 82-87, 2004.

ROY, A.; HU, X.-ZHANG; JANAL, M.N.; GOLDMAN, D. Interaction between Childhood Trauma and Serotonin Transporter Gene Variation in Suicide. **Neuropsychopharmacology**, p. 2046-2052, 2007.

SALUM, GIOVANNI ABRAHÃO; ISOLAN, L.R.; BOSA, V.L.; et al. The multidimensional evaluation and treatment of anxiety in children and adolescents: rationale , design , methods and preliminary findings Avaliação multidimensional e tratamento da ansiedade em crianças e adolescentes : marco teórico , desenho , método. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 33, p. 181-195, 2011.

SANDLER, M.; REVELEY, M.A.; GLOVER, V. Human platelet monoamine oxidase activity in health and disease : a review. **J Clin Pathol**, v. 34, p. 292-302, 1981.

SCHINKA, J.A.; BUSCH, R.M.; ROBICHAUX-KEENE, N. A meta-analysis of the association between the serotonin transporter gene polymorphism (5-HTTLPR) and trait anxiety. **Molecular Psychiatry**, v. 9, p. 197-202, 2004.

SCHMITZ, A.; HENNING, J.; KUEPPER, Y.; REUTER, M. The association between neuroticism and the serotonin transporter polymorphism depends on structural differences between personality measures. **Personality and Individual Differences**, v. 42, p. 789-799, 2007.

SHIOE, K.; ICHIMIYA, T.; SUHARA, T.; et al. No Association Between Genotype of the Promoter Region of Serotonin Transporter Gene and Serotonin Transporter Binding in Human Brain Measured by PET. **Synapse**, v. 48, p. 184 -188, 2003.

SMOLLER, J.W.; BLOCK, S.R.; YOUNG, M.M. Genetics of anxiety disorders: the complex road from DSM to DNA. **Depression and Anxiety**, v. 26, n. 11, p. 965-75, 2009.

SOMERS et al. Prevalence and incidence studies of anxiety disorders: A systematic review of the literature. **Can J Psychiatry**, v.51, p.100–113, 2006.

STRAUSS, C.C.; LAST, C.G.; HERSEN, M.; KADZIN, A.E. Association between anxiety and depression in children and adolescents with anxiety disorders. **J Abnorm Child Psychol**, v.16, p. 57-68, 1988.

STRÜDER, H. K.; WEICKER, H. Physiology and Pathophysiology of the Serotonergic System and its Implications on Mental and Physical Performance. Part I. **International Journal of Sports Medicine**, v. 22, p. 467 - 481, 2001.

STRUG, L. J.; SURESH, R.; FYER, A.; et al. Panic Disorder is Associated with the Serotonin Transporter Gene (SLC6A4) But Not the Promoter Region (5-HTTLPR). **Mol Psychiatry**, v. 15, n. 2, p. 166-176, 2010.

SUNDSTRÖM E, et al. Neurochemical differentiation of human bulbospinal monoaminergic neurons during the first trimester. **Brain Res Dev Brain Res.** v.75, p.1–12, 1993.

TERRACCIANO, A.; TANAKA, T.; SUTIN, A.R.; et al. BDNF Val66Met is Associated with Introversion and Interacts with 5-HTTLPR to Influence Neuroticism. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 5, p. 1083-1089, 2010.

TOCCHETTO, A.; SALUM, G.A; BLAYA, C.; et al. Evidence of association between Val66Met polymorphism at BDNF gene and anxiety disorders in a community sample of children and adolescents. **Neuroscience Letters**, p. 1-4, 2011.

UHER, R; MCGUFFIN P. The moderation by the serotonin transporter gene of environmental adversity in the aetiology of mental illness: review and methodological analysis. **Mol Psychiatry**.v. 13, p.131–146, 2008.

VIVIANI et al. Baseline Brain Perfusion and the SerotoninTransporter Promoter Polymorphism, **Biol Psychiatry**, v. 67, p. 317–322, 2010.

WACHLESKI, C.; BLAYA, C.; SALUM, G.A.; et al. Lack of association between the serotonin transporter promoter polymorphism (5-HTTLPR) and personality traits in asymptomatic patients with panic disorder. **Neuroscience letters**, v. 431, n. 2, p. 173-8, 2008.

WIGGINS et al. The impact of serotonin transporter (5-HTTLPR) genotype on the development of resting-state functional connectivity in children and adolescents: A preliminary report. **NeuroImage**, v.59, p. 2760-2770, 2012.

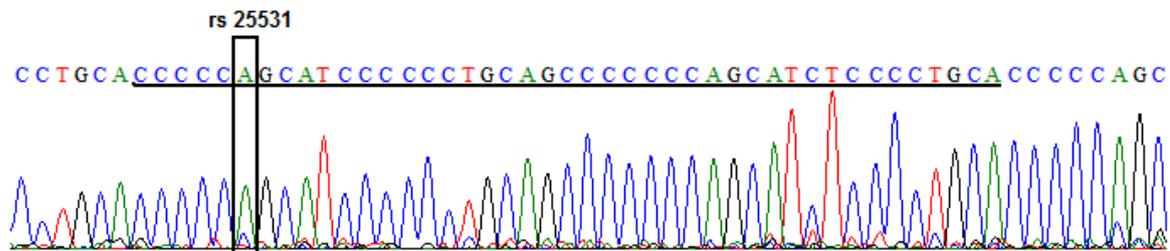
WILLEIT, M.; STASTNY, J.; PIRKER, W.; et al. No Evidence for In Vivo Regulation of Midbrain Serotonin Transporter Availability by Serotonin Transporter Promoter Gene Polymorphism. **Society of Biological Psychiatry**, p. 8-12, 2001.

YOUNG, S.E.; SMOLEN, A.; STALLINGS, M.C.; CORLEY, R.P.; HEWITT, J.K. Sibling-based association analyses of the serotonin transporter polymorphism and internalizing behavior problems in children. **Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines**, v. 44, n. 7, p. 961-7, 2003.

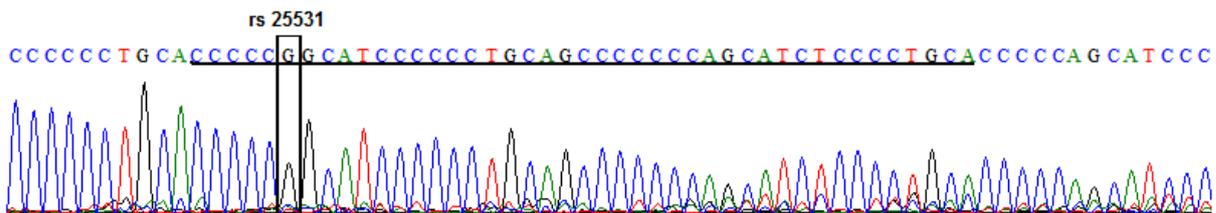
ANEXO 1

Abaixo estão representados segmentos dos cromatogramas indicando o alelo L_A e alelo L_G do 5-HTTLPR. Esses alelos são caracterizados por apresentarem uma inserção de 43 pb que os diferenciam do alelo S, que não possui essa sequência. Em uma classificação trialélica, é importante observarmos o polimorfismo de nucleotídeo único rs25531 que troca uma adenina (A) por guanina (G).

As amostras foram purificadas diretamente do gel de agarose 1% com o Kit *Wizard[®]SV Gel and (PCR) Clean-up System*. Para o sequenciamento, foi utilizado o sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems).



Representação da inserção de 43 pb que caracteriza o alelo L do 5-HTTLPR (sequência sublinhada). O cromatograma destaca o local do possível SNP rs25531 [A/G]. O cromatograma indica o alelo L_A .



Representação da inserção de 43 pb que caracteriza o alelo L do 5-HTTLPR (sequência sublinhada). O cromatograma destaca o local do possível SNP rs25531 [A/G]. O cromatograma indica o alelo L_G .

ANEXO 2

PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO DO MESTRADO

Artigos publicados:

- **Evidence of association between Val66Met polymorphism at BDNF gene and anxiety disorders in a community sample of children and adolescents**

Autores: Andréa Tocchetto; Giovanni A. Salum; Carolina Blaya; Stefania Teche; Luciano Isolan; Andressa Bortoluzzi; Rafael Rebelo e Silva; Juliana A. Becker; Marino M. Bianchin; Luis Augusto Rohde; Sandra Leistner-Segal; Gisele G. Manfro

Revista: *Neuroscience Letters*, v. 502, n° 3, p. 197-200

Ano de publicação: 2011

- **The multidimensional evaluation and treatment of anxiety in children and adolescents: rationale, design, methods and preliminary findings**

Avaliação multidimensional e tratamento da ansiedade em crianças e adolescentes: marco teórico, desenho, métodos e resultados preliminares

Autores: Giovanni Abrahão Salum; Luciano Rassier Isolan; Vera Lúcia Bosa; Andrea Goya Tocchetto; Stephania Pigatto Teche; Ilaine Schuch; Jandira Rahmeier Costa; Marianna de Abreu Costa; Rafaela Behs Jarros; Maria Augusta Mansur; Daniela Knijnik; Estácio Amaro Silva; Christian Costa Kieling; Maria Helena Oliveira; Elza Medeiros; Andressa Bortoluzzi; Rudineia Toazza; Carolina Blaya; Sandra Leistner-Segal; Jerusa Fumagalli de Salles; Patrícia Pelufo Silveira; Marcelo Zubaran Goldani; Elizeth Paz da Silva Heldt; Gisele Gus Manfro

Revista: *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 33, n° 33, p. 181-195

Ano de publicação: 2011

Letter publicada:

- **Is puberty a trigger for 5HTTLPR polymorphism association with depressive symptoms?**

Autores: Giovanni Abrahão Salum; Andressa Bortoluzzi; Patrícia Pelufo Silveira; Vera Lúcia Bosa; Ilaine Schuch; Marcelo Goldani; Carolina Blaya; Sandra Leistner-Segal; Gisele Gus Manfro

Revista: *Journal of Psychiatric Research*

Ano de publicação: 2012

Letter submetida à publicação:

- **Further evidence of facial recognition impairments and 5-HTTLPR**

Polymorphism in adolescence

Autores: Andressa Bortoluzzi; Rafaela Behs Jarros; Carolina Blaya; Giovanni Abrahão Salum; Cristiano Tschiedel Belem da Silva; Sandra Leistner-Segal; Gisele Gus Manfro

Revista: *Journal of the INTERNATIONAL NEUROPSYCHOLOGICAL SOCIETY*

(ID: JINS#-12-031-LE)

Ano de submissão: 2012

ANEXO 3

CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

Projeto: 100330

Versão do Projeto: 29/07/2010

Pesquisadores:

SANDRA LEISTNER SEGAL

ANDRESSA BORTOLUZZI

GISELE GUS MANFRO

Título: Estudo da Associação entre o Polimorfismo da Região Promotora do Gene Transportador de Serotonina (5-HTTLPR) e os Transtornos de Ansiedade na Infância e Adolescência

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada imediatamente ao CEP/HCPA.

Porto Alegre, 22 de outubro de 2010.


Profª Nadine Clausell
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA

ANEXO 4

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES DO PROJETO ORIGINAL

Estamos realizando uma pesquisa sobre influência genética e do ambiente em quadros de ansiedade em crianças e adolescentes.

A causa dos Transtornos de Ansiedade é multifatorial, ou seja, existem tanto fatores genéticos quanto fatores do ambiente (relações familiares, situações estressoras) que contribuem para a doença. O objetivo desse estudo é verificar se existe relação entre um determinado gene e transtornos de ansiedade na infância/adolescência. Também será estudada a relação de alguns problemas do ambiente com os quadros de ansiedade. A avaliação será realizada em dois dias, e consistirá em duas entrevistas psiquiátricas e na coleta de saliva que identificará alguns genes que podem estar associados à ansiedade, além do preenchimento de alguns questionários. A coleta de saliva é simples e rápida (expelida pelo próprio participante em um recipiente específico). Os questionários que as crianças/adolescentes responderão são de resposta objetiva (de marcar) sobre ansiedade, humor e situações traumáticas. O familiar responsável também responderá a questionários sobre seu filho, e também sobre problemas familiares, além de uma breve avaliação sobre problemas psiquiátricos nos pais. Caso o diagnóstico de transtorno de ansiedade seja confirmado, o paciente será encaminhado para tratamento junto à equipe do HCPA.

Eu..... fui informado dos objetivos acima descritos e da justificativa pela qual estão sendo utilizadas as escalas (questionários) de forma clara e detalhada. Sei que poderei solicitar novos

ANEXO 5



**TERMO DE COMPROMISSO PARA UTILIZAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO E
INFORMAÇÕES ASSOCIADAS**

Título do Projeto

Estudo da Associação entre o Polimorfismo da Região Promotora do Gene Transportador de Serotonina (5-HTTLPR) e os Transtornos de Ansiedade na Infância e Adolescência

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos pacientes, cujos materiais biológicos estão mantidos em biorepositórios, bem como de suas respectivas informações associadas, contidas em prontuários e bases de dados do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima.

Porto Alegre, ____ de _____ de 2010.

Nome dos Pesquisadores	Assinatura
Andressa Bortoluzzi	
Gisele Gus Manfro	
Sandra Leistner segal	

ANEXO 6

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: NEUROCIÊNCIAS

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Os transtornos de ansiedade são prevalentes na infância e na adolescência e estão associados a prejuízos significativos ao longo do desenvolvimento da pessoa, influenciando o convívio social e familiar, por exemplo. É interessante aprofundarmos as pesquisas sobre esse assunto, no Brasil, para tentarmos esclarecer as prováveis causas ou fatores facilitadores para o desencadeamento desses transtornos de ansiedade.

Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar um fator biológico que possa estar associado à sintomatologia dos transtornos de ansiedade, suas comorbidades e prejuízos acadêmicos e sociais em escolares brasileiros.

Seu filho/a está sendo convidado para participar da pesquisa “**Estudo da Associação entre o Polimorfismo da Região Promotora do Gene Transportador de Serotonina (5-HTTLPR) e os Transtornos de Ansiedade na Infância e Adolescência**”, que visa utilizar uma amostra de material biológico (SALIVA) para a análise genética. Essa avaliação poderá esclarecer algumas questões sobre os transtornos de ansiedade. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação.

Você poderá entrar em contato conosco para tirar dúvidas relacionadas ao projeto, técnicas empregadas nas análises do material biológico ou quaisquer outras

possíveis. Estaremos à disposição através dos meios de comunicação ao final desta página.

Estando de acordo, gostaríamos que assinasse o documento e agradecemos a sua contribuição para o meio científico.

Porto Alegre,.....de.....de.....

Assinatura do pai/mãe ou responsável

Assinatura do aluno

Assinatura da responsável pela pesquisa
(Andressa Bortoluzzi ou Gisele Gus Manfro)

Fones de contato: (051) 33928063 (051) 93232433

e-mail: andresbt10@yahoo.com.br ou gmanfro@portoweb.com.br