

Simone Becho de Campos

Estudo de Associação entre o Transtorno Bipolar
e o gene da enzima Triptofano Hidroxilase 2

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Belo Horizonte
2009

Simone Becho de Campos

Estudo de Associação entre o Transtorno Bipolar e o gene da enzima Triptofano Hidroxilase 2

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Neurociências da Universidade
Federal de Minas Gerais como
requisito parcial para obtenção do
Título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Corrêa

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2009

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos...

... e em especial ao Bruno.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao Bruno pelo amor, carinho e paciência. Sempre me incentivando a buscar mais e mais conhecimentos. Um exemplo de pesquisador! Obrigada por tudo!

Ao meu orientador, Prof. Humberto Correa pela confiança e oportunidade concedida. Aceitou orientar-me sem que eu tivesse qualquer tipo de experiência em pesquisa, apenas força de vontade.

Agradeço à Dra. Débora Marques pelos ensinamentos, disponibilidade, acolhimento e amizade. Sem você eu não chegaria até aqui.

Aos professores Marco Aurélio Romano Silva e Luiz Armando De Marco pela oportunidade de conviver com pesquisadores como vocês.

Aos meus pais, exemplo de vida e que sempre me deram suporte nas minhas decisões. Aos meus irmãos Alexandre e Henrique pelo apoio e constante compreensão.

À Alessandra, Thales, Cássia e Osvino por sempre torcerem por mim. Adoro vocês!

Aos amigos de Ouro Branco, BH e demais familiares pela compreensão da minha ausência.

A todos os integrantes do Laboratório de Neurociências, e principalmente à Paty, Karen, Kel, Magno e Vitor pela amizade e ensinamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
RESUMO.....	10
ABSTRACT	11
I . INTRODUÇÃO	12
I.I. TRANSTORNO BIPOLAR.....	13
I.II. ETIOPATOGENIA DO TRANSTORNO BIPOLAR.....	15
I.III. TRANSTORNO BIPOLAR E SUICÍDIO	16
I.IV. TRANSTORNO BIPOLAR E COMORBIDADES	18
I.V. SISTEMA SEROTONINÉRGICO.....	20
I.VI. GENE CANDIDATO	24
II. OBJETIVOS	28
II.I. OBJETIVO GERAL	29
II.II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
III.I. AMOSTRA ESTUDADA	31
III.II. ESTUDO GENOTÍPICO	32
III.III. ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
IV. RESULTADOS.....	37
V. DISCUSSÃO	48
VI. BIBLIOGRAFIA	53

LISTA DE ABREVIATURAS

TB – Transtorno Bipolar

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

ECA – *Epidemiologic Catchment Area*

TP – Transtorno de Pânico

NCS - *National Comorbidity Survey*

5-HT – 5-hidroxitriptamina

MAO – Monoaminoxidase

5-HIAA - Ácido 5-hidroxiindolacético

TPH – Triptofano hidroxilase

SNC – Sistema nervoso central

DNA – Ácido desoxirribonucléico

RNA – Ácido ribonucléico

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

PCR – do inglês, polymerase chain reaction - Reação em cadeia de polimerase

ABI - *Applied Biosystems Inc.*

SNP – do inglês, single nucleotide polymorphism - Polimorfismo de nucleotídeo único

EHW – Equilíbrio de Hardy-Weinberg

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SEROTONINA	20
FIGURA 2 - SÍNTESE DA SEROTONINA A PARTIR DO TRIPTOFANO.....	21
FIGURA 3 - DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS MARCADORES	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS	32
TABELA 2 – INFORMAÇÕES REFERENTES AOS SNPS UTILIZADOS.....	35
TABELA 3 – RELAÇÃO DOS MARCADORES E SEQUÊNCIA ALVO DOS POLIMORFISMOS ESTUDADOS NO GENE DA TPH2	35
TABELA 4 – FREQUÊNCIA ALÉLICA DOS POLIMORFISMOS DO GENE DA TPH2 NOS CASOS/CONTROLES.....	38
TABELA 5 – FREQUÊNCIA GENOTÍPICA DOS POLIMORFISMOS DO GENE DA TPH2 NOS CASOS/CONTROLES.....	39
TABELA 6 – FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA DOS POLIMORFISMOS DO GENE DA TPH2 NOS CASOS/CONTROLES.....	40
TABELA 7 – FREQUÊNCIA ALÉLICA DOS POLIMORFISMOS DO GENE DA TPH2 NO COMPORTAMENTO SUICIDA.....	41
TABELA 8 – FREQUÊNCIA GENOTÍPICA DOS POLIMORFISMOS DO GENE DA TPH2 NO COMPORTAMENTO SUICIDA.....	42
TABELA 9 – FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA DOS POLIMORFISMOS DO GENE DA TPH2 NO COMPORTAMENTO SUICIDA.....	43
TABELA 10 – FREQUÊNCIA ALÉLICA DOS POLIMORFISMOS DO GENE DA TPH2 NA COMORBIDADE PÂNICO.....	44
TABELA 11 – FREQUÊNCIA GENOTÍPICA DOS POLIMORFISMOS DO GENE DA TPH2 NA COMORBIDADE PÂNICO	45

TABELA 12 – FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA DOS POLIMORFISMOS DO GENE DA TPH2 NA COMORBIDADE PÂNICO	46
---	-----------

RESUMO

O Transtorno Bipolar (TB) é um transtorno psiquiátrico caracterizado pela ocorrência de episódios de humor elevado que, em geral, se alternam com episódios de depressão. A prevalência ao longo da vida para o transtorno bipolar tipo I é estimada em 0,4 a 1,6% utilizando os critérios do DSM-IV. Distúrbios no sistema serotoninérgico foram associados com a patofisiologia dos transtornos afetivos, comportamento suicida e transtorno do pânico. A triptofano hidroxilase 2 (TPH2) é uma enzima limitante na via da síntese de serotonina e seu gene é considerado um importante gene candidato para transtornos psiquiátricos. O objetivo do nosso estudo foi investigar a possível associação entre polimorfismos no gene da TPH2 e a susceptibilidade ao TB, comportamento suicida e transtorno do pânico como comorbidade. Nossa amostra consistiu em 527 indivíduos (303 com diagnóstico de TB e 224 indivíduos controle) que foram genotipados utilizando oito TagSNPs (*rs4448731*, *rs4565946*, *rs11179000*, *rs7955501*, *rs10506645*, *rs4760820*, *rs1487275* e *rs10879357*). As análises estatísticas foram feitas utilizando os programas Unphased versão 3.0.12 e Haploview. As análises de associação de alelos, genótipos e haplótipos não mostraram associação genética significativa com o TB e o comportamento suicida. Encontramos associação significativa de alelo, genótipo e haplótipo com a comorbidade de transtorno do pânico em pacientes com TB e variantes no gene da TPH2. Nossos achados não suportam a associação entre TB, comportamento suicida e polimorfismos no gene da TPH2, mas sugerem que polimorfismos no gene da TPH2 podem conferir susceptibilidade a comorbidade pânico em pacientes com TB. Estudos adicionais são necessários para replicar a associação positiva que observamos.

ABSTRACT

Bipolar disorder (BD) is a severe psychiatric illness characterized by the occurrence of elevated mood alternating with depressive episodes. Lifetime prevalence for bipolar disorder type I is estimated from 0,4 to 1,6% using DSM-IV criteria for bipolar disorder. Disturbance of the central serotonergic system has been associated with the pathophysiology of affective disorders, suicidal behavior and panic disorder. Tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) is a rate-limiting enzyme in serotonin synthesis and is considered an important candidate gene for psychiatric disorders. The aim of our study is to investigate a possible association between TPH2 gene polymorphisms and BD, suicidal behavior and panic disorder comorbidity susceptibility. Our sample consisted in 527 subjects (303 with a bipolar disorder diagnosis and 224 health controls) which were genotyped for eight TagSNPs (*rs4448731*, *rs4565946*, *rs11179000*, *rs7955501*, *rs10506645*, *rs4760820*, *rs1487275* and *rs10879357*). Statistical analyses were performed by UNPHASED version 3.0.12 and Haploview. Single markers, genotype and haplotype association analysis did not show significant genetic association with bipolar disorder and suicidal behavior. However, we found a significant allele, genotype and haplotype associations with panic comorbidity in patients with bipolar disorder and TPH2 gene variants. Our findings do not support the association between BD diagnosis, suicidal behavior and TPH2 polymorphisms, but suggest that polymorphisms in TPH2 gene may confer susceptibility to panic disorder comorbidity in patients with bipolar disorder. Further studies are needed to replicate the positive association that we observed.

I. INTRODUÇÃO

I.I - TRANSTORNO BIPOLAR

O Transtorno Bipolar (TB) é um transtorno mental complexo, multifatorial, potencialmente grave e que está associado com elevada morbidade e mortalidade (Kilbourne e cols. 2004). O transtorno afeta igualmente homens e mulheres, iniciando sua sintomatologia entre 15-30 anos de idade (Goodwin & Jamison 1990). É caracterizado por episódios recorrentes de mania e depressão, podendo ser subdividido em duas entidades diagnósticas: TB tipo I, cuja característica central é a presença de pelo menos um episódio maníaco, TB tipo II, caracterizado pela presença de episódios de depressão e hipomania (Calabrese e cols. 2004).

Os critérios diagnósticos atuais do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – 4ª edição (DSM-IV) são:

1. Transtorno Bipolar tipo I:

A característica essencial do Transtorno Bipolar I é um curso clínico caracterizado pela ocorrência de um ou mais episódios maníacos. Com freqüência, os indivíduos também tiveram um ou mais episódios depressivos maiores. Os critérios diagnósticos são:

- um período distinto de humor anormal e persistentemente elevado, expansivo ou irritável, com duração mínima de 1 semana (ou qualquer duração se for preciso internação);
- durante o período de perturbação do humor, três (ou mais) dos seguintes sintomas persistiram (quatro, se o humor é apenas irritável) e estiveram presentes em um grau significativo:

(1) auto-estima inflada ou grandiosidade.

(2) redução da necessidade de sono.

(3) mais loquaz do que o habitual ou pressão para falar.

(4) fuga de idéias ou experiência subjetiva de que os pensamentos estão acelerados.

(5) distratibilidade (quando a atenção é desviada com excessiva facilidade para estímulos externos insignificantes ou irrelevantes).

(6) aumento da atividade dirigida a objetivos (socialmente, no trabalho, na escola ou sexualmente) ou agitação psicomotora.

(7) envolvimento excessivo em atividades prazerosas com um alto potencial para conseqüências dolorosas (por exemplo, envolvimento em surtos incontidos de compras, indiscrições sexuais ou investimentos financeiros tolos).

- os sintomas não satisfazem os critérios para episódio misto;

- a perturbação do humor é suficientemente grave a ponto de causar prejuízo acentuado no funcionamento ocupacional, nas atividades sociais ou relacionamentos costumeiros com outros, ou de exigir a hospitalização, como um meio de evitar danos a si mesmo e/ou a terceiros;

- os sintomas não se devem aos efeitos fisiológicos diretos de uma substância (por exemplo, droga de abuso ou medicamento) ou de uma condição médica geral (por exemplo, hipertiroidismo).

2. Transtorno Bipolar tipo II

A característica essencial do Transtorno Bipolar II é um curso clínico marcado pela ocorrência de um ou mais episódios depressivos maiores, acompanhados por pelo menos um episódio hipomaníaco. Os critérios diagnósticos são:

- ausência de episódio maníaco ou misto;
- os sintomas de humor (depressão ou hipomania) não são mais bem explicados por transtorno esquizoafetivo nem estão sobrepostos a esquizofrenia, transtorno esquizofreniforme, transtorno delirante ou transtorno psicótico sem outra especificação;
- os sintomas causam sofrimento clinicamente significativo ou prejuízo no funcionamento social ou ocupacional ou em outras áreas importantes da vida do indivíduo.

O TB pode ter uma prevalência ao longo da vida de 0,5% a 7,5%, dependendo da amplitude dos critérios diagnósticos com a introdução do conceito de espectro bipolar (Judd & Akiskal 2003; Angst e cols. 2003). Segundo o DSM-IV, a prevalência do TB tipo I varia de 0,4 a 1,6%.

I.II – ETIOPATOGENIA DO TRANSTORNO BIPOLAR

Apesar de se desconhecer a base causal do TB, sugere-se que exista interação complexa entre fatores biológicos e psicossociais.

Dentre os fatores biológicos está a teoria das monoaminas que sugere deficiência funcional da transmissão monoaminérgica (serotonina, dopamina e noradrenalina) no sistema nervoso central, visto que são extensivamente distribuídos nos circuitos límbico-estriado-córtex pré-frontal, regiões que controlam as manifestações comportamentais dos transtornos de humor (Brunello & Tascedda 2003).

Não existem dúvidas quanto à importância dos fatores genéticos na etiologia do TB. Resultados de estudos com famílias, gêmeos e adoção demonstram essa base genética (Craddock & Jones 1999). A concordância entre

gêmeos monozigóticos varia de 60% a 80% e o risco de desenvolver TB em parentes de primeiro grau de um portador situa-se entre 2% e 15% (Cardno e cols. 1999). Mendlewicz & Rainer (1977) verificaram 29 adotados com TB e observaram uma prevalência de distúrbios afetivos em 31% dos pais biológicos desses indivíduos, comparado a uma prevalência de 12% nos pais adotivos. Esses dados sugerem que o TB apresenta alta herdabilidade, entretanto, o modo de herança parece complexo, cujo aparecimento depende da presença de genes de vulnerabilidade e da interação destes com a influência ambiental.

Os fatores psicossociais estão relacionados aos acontecimentos vitais estressores, que, segundo Payel (2003), podem ser morte de ente querido, divórcio e problemas financeiros. Esses eventos apresentam uma associação causal com a depressão (Kendler e cols. 1999). Porém, apesar da forte correlação entre os eventos estressores e a depressão, parte dessa associação é não causal, pois fatores de risco genético para alguns eventos estressores estão correlacionados com a predisposição genética para a depressão (Kendler e cols. 1997). Evidências sugerem que fatores genéticos desempenham um papel na vulnerabilidade à depressão, em parte sendo moderada por respostas individuais a esses acontecimentos estressores. A combinação da genética, eventos estressores na infância e estresse contínuo podem vir a determinar respostas individuais ao estresse e à vulnerabilidade para transtornos psiquiátricos (Charney & Manji, 2004).

I.III – TRANSTORNO BIPOLAR E SUICÍDIO

Pacientes com TB apresentam alto risco para comportamento suicida. O risco de suicídio nesses pacientes é de aproximadamente 1% ao ano, cerca de 60

vezes o risco na população geral, que chega a 0,015% anualmente. O risco de tentativa de suicídio entre os pacientes com TB é de aproximadamente 3,9% anualmente ou aproximadamente 3 vezes maior que a taxa de suicídio completo (1,4% anualmente) (Tondo e cols. 2003). A letalidade dos atentados suicidas em pacientes com TB é 10 vezes maior que na população em geral (Baldessarini e cols. 2006).

O suicídio é um ato multideterminado. É conhecida a importância dos fatores psiquiátricos, sociais e biológicos como fatores determinantes do comportamento suicida. Análises de famílias e de gêmeos monozigóticos e dizigóticos indicam a presença de um forte componente genético relacionado tanto às tentativas de suicídio quanto ao suicídio completo. O risco de suicídio para parentes de suicidas é seis vezes maior do que o risco na população (Brent e cols. 1996). Estudos com gêmeos mostram uma maior concordância em gêmeos monozigóticos comparados a dizigóticos tanto para o suicídio completo quanto para as tentativas de suicídio (Roy e cols. 1993). Estudos de adoção corroboram estes resultados, demonstrando que o risco de suicídio é mais alto entre os pais biológicos de filhos adotivos que cometeram suicídio em comparação a pais biológicos de filhos adotivos sem comportamento suicida (Schulsinger e cols. 1979). A predisposição ao comportamento suicida segrega na família independentemente da doença psiquiátrica primária (Brent e cols. 1988), ou seja, famílias podem ter pessoas apresentando comportamento suicida, mesmo que cada uma tenha o diagnóstico de uma doença de Eixo I (depressão, transtornos de ansiedade, distúrbio bipolar, transtorno do déficit de atenção e hiperatividade e esquizofrenia) ou II (transtorno de personalidade borderline, transtorno de personalidade esquizotípica e transtorno de personalidade anti-

social) diferente. Estas evidências contribuem para o entendimento de que o comportamento suicida tem um componente genético na sua predisposição, independente da doença psiquiátrica presente inicialmente. Além disso, fatores ambientais (estresse, trauma, abuso de substâncias) parecem ser decisivos no aparecimento e evolução da patologia.

I.IV – TRANSTORNO BIPOLAR E COMORBIDADES

A prática clínica cotidiana com pacientes com TB revela que os casos de comorbidade são bastante freqüentes. O termo comorbidade é formado pelo prefixo “cum”, que significa contigüidade, correlação, companhia, e pela palavra morbidade, originada de “morbus”, que designa estado patológico ou doença. Assim, é utilizado para descrever a coexistência de transtornos ou doenças.

A comorbidade do TB com outros transtornos psiquiátricos e com doenças clínicas é freqüente e está associada à pior resposta ao tratamento (Goodwin & Jamison 1990; Cole e cols. 1993). Os índices de comorbidade entre pacientes com TB variam de 30% a quase 100%, conforme a metodologia e amostra selecionada (Kessler e cols. 1997; Vieta e cols. 2001).

Sharma e colaboradores (1995), em um estudo sobre o padrão de comorbidades na depressão bipolar e unipolar resistentes, observaram que 75,5% da população estudada apresentavam um segundo diagnóstico, e que 46,9% apresentavam dois ou mais diagnósticos adicionais atuais. A comorbidade atual com transtornos ansiosos foi a mais frequentemente encontrada (83,6%). Os transtornos ansiosos e o abuso de substâncias foram as comorbidades mais freqüentes ao longo da vida (60% e 30%, respectivamente).

Chen e Dilsaver (1995) analisaram os dados do *Epidemiologic Catchment Area* (ECA) e relataram que o transtorno do pânico é a comorbidade psiquiátrica mais freqüente em bipolares (prevalência para vida toda de 20,8%, 26 vezes maior que em indivíduos controle).

Os pacientes bipolares que têm comorbidades com transtornos de ansiedade parecem apresentar características clínicas de maior gravidade. Pesquisas sugerem a associação dos sintomas ansiosos com pior prognóstico, maior índice de tentativas de suicídio e pior resposta aos estabilizadores do humor (Young e cols. 1993; Feske e cols. 2000). Young e colaboradores (1993) em um estudo que incluiu 81 pacientes com TB encontraram alto nível de ansiedade em 24% dos pacientes. Esse grupo apresentou mais tentativas de suicídio, mais abuso de álcool e responderam pior ao tratamento com lítio.

A comorbidade de transtorno bipolar e transtorno de pânico (TP) é muito comum, tanto em estudos populacionais quanto em amostras clínicas (Freeman e cols. 2002). Segundo o *National Comorbidity Survey* (NCS), aproximadamente um terço dos pacientes com TB tipo I preencheram critérios para TP. Doughty e colaboradores (2004) sugerem até a possibilidade de que os pacientes com essa comorbidade formem um subgrupo distinto de TB.

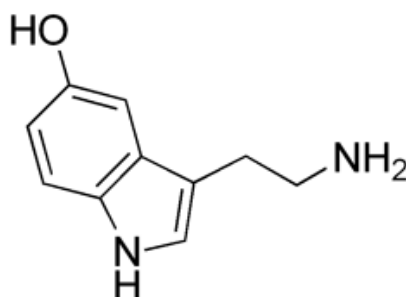
A ligação entre TB e TP também tem sido demonstrada através de estudos genéticos (MacKinnon e cols. 1997; 1998). MacKinnon e colaboradores (2002) estudaram 203 famílias com TB e demonstraram que a história familiar de TB é fator de risco para TP. Essa idéia também foi reforçada por Doughty e colaboradores que avaliaram 109 famílias bipolares e confirmaram os dados de que o TP é primariamente associado com transtorno afetivo em famílias que têm história de TB. Esse achado clínico é corroborado por estudos que encontraram

associação da comorbidade TP e marcadores no braço longo cromossomo 18 em pacientes com TB (Vieta e cols. 2001). Rotondo e colaboradores (2002) encontraram diferença significativa nos polimorfismos de enzimas relacionadas aos neurotransmissores, especialmente a serotonina, entre o grupo de bipolares com TP comórbido e no grupo com TB sem TP.

I.V – SISTEMA SEROTONINÉRGICO

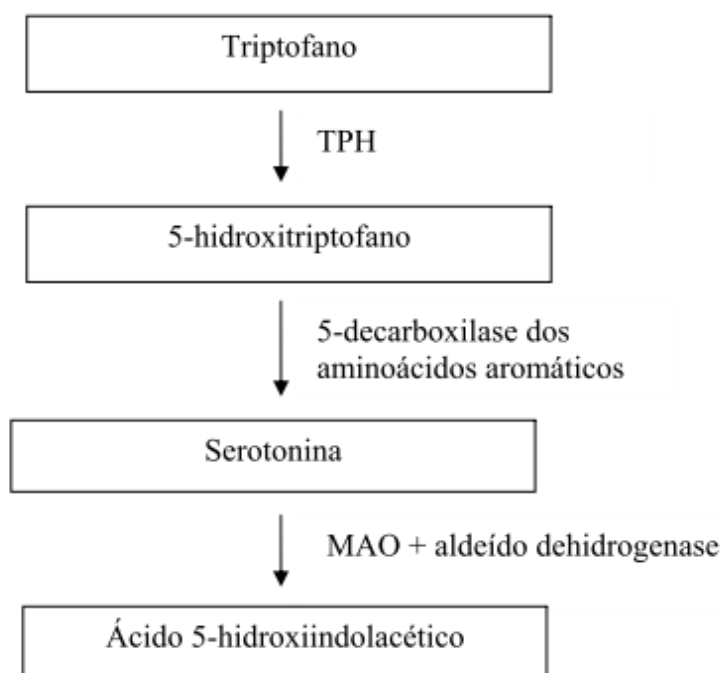
A descoberta da serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) ocorreu na década de 50 quase simultaneamente em centros na Itália e nos Estados Unidos, realizando trabalhos independentes. Fisiologistas do século passado já sabiam da existência de uma substância vasoconstritora no sangue que, ao passar pelos pulmões, perdia suas propriedades hipertensivas. Rapport, em Cleveland, estudando fatores hipertensores humorais do tipo da angiotensina, conseguiu isolar essa substância numa forma cristalina, chamando-a de serotonina (Figura 1) (Rapport e cols. 1948; Erspamer & Asero, 1952). Em 1951, Hamlin e Fischer conseguiram sintetizar a molécula proposta por Rapport e verificaram que seu composto tinha todas as propriedades atribuídas à serotonina.

Figura 1. Estrutura química da serotonina



A síntese da serotonina ocorre dentro dos corpos dos neurônios serotoninérgicos, principalmente aqueles localizados no núcleo da rafe (Gallagher & Aghajantan 1976). O processo envolve duas enzimas: a primeira, a triptofano hidroxilase, que é a enzima limitante na síntese de 5-HT e converte o triptofano em 5-hidroxitriptofano. Esse composto intermediário é encontrado em pequena quantidade, pois sua conversão a 5-HT é rápida. A enzima responsável por essa eficiente conversão, a decarboxilase dos aminoácidos aromáticos, é amplamente distribuída e age sobre um grande espectro de substratos, tendo reservas capazes de responder a cargas de 5-hidroxitriptofano, muitas vezes superiores ao normal (Figura 2).

Figura 2. Síntese da serotonina a partir do triptofano



Uma vez produzida, a 5-HT é armazenada em vesículas pré-sinápticas localizadas nos terminais axônicos. Estudos em ratos demonstraram que a atividade de liberação das vesículas obedece a um padrão rítmico lento (Gallagher & Aghajantan 1976) e que a liberação é dependente da atividade neuronal. Esse padrão parece ser uma variação fisiológica, visto que em gatos essa atividade diminui durante o sono (Puizillout e cols. 1979). Após a liberação da serotonina na fenda sináptica para a ação como neurotransmissor, ela pode ser recaptada para o terminal axônico pelos receptores pré-sinápticos ou, então, ser degradada na sinapse.

O metabolismo da 5-HT envolve outra enzima encontrada em quantidade abundante e com propriedades sobre vários substratos, a monoaminoxidase (MAO). A MAO juntamente com a enzima aldeído desidrogenase converte a 5-HT em ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA).

A serotonina (5-HT) modula diferentes atividades neuronais e, desse modo, diversas funções fisiológicas e comportamentais, como controle de impulsos, agressividade e tendências suicidas (Shiah & Yatham 2000). Desta forma, diminuição da liberação e da atividade da 5-HT podem estar associadas a algumas anormalidades como ideação suicida, tentativas de suicídio, agressividade e distúrbios do sono, achados freqüentes nos transtornos bipolares (Ackenheil 2001).

Os neurônios que produzem serotonina estão localizados em uma zona restrita do tronco encefálico. A maioria encontra-se nos núcleos da rafe, na linha média do rombencéfalo, com um número pequeno na formação reticular. Os neurônios contendo serotonina são conhecidos como grupo de células B1-B9 (Dahlstrom & Fuxe 1964) e aglomeram-se em dois subgrupos: a divisão caudal

(B1-B5, correspondendo a rafe *palidus*, *magnus*, *obscurus* e ponte) e a divisão anterior (B6-B9, correspondendo aos núcleos da rafe medial e dorsal) (Lidov & Molliver 1982; Wallace & Lauder 1983).

Vários estudos têm demonstrado que distúrbios no sistema serotoninérgico estão envolvidos na patofisiologia de transtornos afetivos (Young e cols. 1994; Shiah & Yatham 2000; Harvey e cols. 2004) e também no comportamento suicida (Correa e cols. 2000, 2002; Segal e cols. 2006; Li & He, 2007).

O decréscimo dos níveis de ácido 5 hidroxindolacético (5-HIAA), principal metabólito da serotonina, no líquido cérebro espinhal e em tecidos cerebrais de indivíduos com depressão e vítimas de suicídio sugerem fortemente distúrbios na neurotransmissão serotoninérgica nos transtornos afetivos (Meltzer 1989; Mann e cols. 1990; Placidi e cols. 2001).

Um estudo *post-mortem* de cérebros de pacientes com TB também constatou níveis significativamente menores de 5-HIAA no córtex frontal e parietal, comparados com controles, fornecendo mais uma evidência para a hipótese de diminuição na atividade serotoninérgica central em transtornos bipolares (Young e cols.1994).

Os neurônios serotoninérgicos centrais são os primeiros alvos dos antidepressivos tricíclicos e inibidores seletivos de recaptação de serotonina, bem como dos psicoestimulantes e drogas (Murphy 2003), sendo assim, mais uma evidencia da disfunção serotoninérgica nos transtornos afetivos.

Por esses achados neurobiológicos, os genes envolvidos na via serotoninérgica têm recebido especial atenção no esforço de desvendar as bases genéticas dos transtornos de humor e suicídio.

I.VI – GENE CANDIDATO

Os estudos de genes candidatos tem como objetivo tentar localizar genes associados a um determinado transtorno, e a escolha desses genes é feita a partir de hipóteses neurobiológicas do transtorno. O estudo de genes candidatos é um tipo de estudo de associação, onde verifica-se se a frequência de determinadas variações na estrutura do gene são significativamente diferentes entre a população de afetados e a de não afetados.

Vários genes-candidato têm sido investigados em estudos de associação no transtorno bipolar (Serretti & Mandelli 2008). Um gene candidato para fenômenos comportamentais como o transtorno bipolar e o comportamento suicida é o gene da enzima triptofano hidroxilase (TPH). A TPH é a enzima limitante na via da síntese de serotonina e pertence à superfamília das hidroxilases de aminoácidos aromáticos (Fitzpatrick 1999).

Duas isoformas da TPH foram identificadas e são denominadas TPH1 e TPH2. O gene da enzima TPH1, localizado no cromossomo 11p15, foi estudado como um gene candidato para transtornos afetivos e esquizofrenia (Nielsen e cols. 1998; Paik e cols. 2000) antes da descoberta da TPH2. Walther e colaboradores (2003) observaram que camundongos *knockout* para TPH1 apresentavam níveis cerebrais de serotonina normais, sugerindo que a TPH1 não era a enzima limitante da síntese de serotonina no SNC. Após a identificação da TPH2, o grupo demonstrou que ela se expressa exclusivamente no SNC. Seu gene localiza-se no cromossomo 12q21.1 e compreende 11 exons.

As proteínas codificadas por TPH1 e TPH2 apresentam 71% da seqüência de aminoácidos idênticos, sendo que os resíduos funcionalmente

importantes no TPH1 são altamente conservados no TPH2 (Walther & Bader 2003).

Diversos estudos vem tentando elucidar a associação da enzima TPH2 e o TB, suicídio e TP.

Zill, Buettner e colaboradores (2004) demonstraram que, em humanos, a quantidade expressa de TPH1 e TPH2 em diversas regiões do cérebro são quase iguais (córtex frontal, tálamo, hipocampo, hipotálamo e amígdala), com uma expressão predominante de TPH2 no tronco cerebral, principal localização dos neurônios produtores de serotonina, enquanto o RNA mensageiro da TPH1 está exclusivamente presente em tecidos periféricos (coração, pulmão, rim, duodeno, fígado e glândula supra-renal).

Van Den Bogaert e colaboradores (2006), pesquisando polimorfismos no gene da TPH2, observaram que o alelo C do *rs4131348* apresenta um efeito protetor em pacientes com transtorno bipolar. Também observaram um decréscimo significativo da frequência do haplótipo TGTT (*rs11178997-rs10748185-rs2129575-rs1843809*) em pacientes com transtorno bipolar, o que sugere a presença de um fator protetor localizado nesse haplótipo.

Cichon e colaboradores (2008) investigaram variantes genéticas no gene da TPH2 através de sequenciamento e genotipagem. O polimorfismo funcional, que resulta da substituição Pro206Ser, mostrou associação significativa com TB. O estudo desse polimorfismo funcional sugere redução da estabilidade e solubilidade da enzima mutante, resultando em redução da produção de 5-HT no cérebro, o qual pode ser um mecanismo patofisiológico do TB. Os autores também investigaram a associação de quatro SNPs com a ideação suicida no

grupo de pacientes com TB e não encontram associação significativa entre os dois grupos.

Lin e colaboradores (2007) encontraram associação significativa entre haplótipos no gene da TPH2 e o TB. Os SNPs localizados na região promotora e no exon 2 do gene da TPH2 causam prejuízo funcional importante na atividade da enzima indicando região potencial de susceptibilidade para o TB.

Zill e colaboradores (2004a) relataram uma associação entre o SNP não funcional - *rs1386494* (localizado no intron 5) – com o transtorno depressivo maior, observando uma frequência maior do alelo G entre os casos. Em outro estudo, Zill (2004b) observou associação entre o bloco de haplótipos, localizados entre os exons 5 e 7 e o risco de suicídio, sugerindo um possível envolvimento de polimorfismos na região reguladora do gene, ou genes adjacentes, na etiologia dos transtornos de humor e do suicídio.

Grigoriu-Serbanescu e colaboradores (2008) genotiparam 15 SNPs do gene da TPH2, incluindo o SNP funcional Pro206Ser, que foi encontrado em um paciente com TB I e ausente nos controles. Os autores encontraram resultados significativos com 3 outros SNPs, sugerindo o envolvimento de variações genéticas no gene da TPH2 e a susceptibilidade ao TB tipo I.

Outros autores também encontraram associações positivas de SNPs no gene da TPH2 e o TB e suicídio (Lopez de Lara e cols. 2007; Lopez e cols. 2007; Harvey e cols. 2007; Ke e cols. 2006). Porém, alguns estudos encontraram associações negativas entre SNPs no gene da TPH2 e o TB e suicídio (Mann e cols. 2008; De Luca e cols. 2006).

Mann e colaboradores (2008) investigaram o SNP -C8347G (*rs4131347*) e não encontraram associação entre o polimorfismo estudado e o TB e a tentativa de suicídio.

De Luca e colaboradores (2006) investigaram os SNPs -473T>A e -8396G>C do gene da TPH2 e o suicídio completo em indivíduos com TB e esquizofrenia. Nenhuma associação foi encontrada entre o comportamento suicida e os SNPs.

Maron e colaboradores (2007) não encontraram associação significativa entre os SNPs *rs1386494* e *rs1386483* tanto na amostra total de pacientes com TP nem no subgrupo com ou sem comorbidade afetiva. Porém, encontraram associação positiva do *rs1386494* com o grupo de pacientes mulheres com TP.

Kim e colaboradores (2009) e Mossner e colaboradores (2006) estudaram o polimorfismo funcional *rs4570625* em pacientes com TP e controles. O primeiro encontrou diferença significativa da frequência alélica entre pacientes com TP e controles. Já o segundo autor não encontrou diferenças significativas entre os grupos.

A partir dos estudos citados acima, verificamos que os resultados ainda são conflitantes. A partir disso, consideramos importante estudar SNPs no gene da TPH2 em uma amostra brasileira de pacientes com transtorno bipolar para verificar se há associação dos mesmos com a susceptibilidade ao transtorno bipolar e dados clínicos, como suicídio e comorbidade pânico, nesses indivíduos.

II. OBJETIVOS

II.I – Objetivo geral

- Investigar possíveis associações entre a enzima triptofano hidroxilase 2 e o transtorno bipolar.

II.II – Objetivos Específicos

- analisar as freqüências gênicas de polimorfismos no gene da TPH2 em um grupo de pacientes com transtorno bipolar comparando-os a um grupo controle.
- investigar se as freqüências de polimorfismos no gene da TPH2 estão associadas a dados clínicos como comportamento suicida e transtorno do pânico como comorbidade.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1 – Amostra estudada

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Previdência do Estado de Minas Gerais e do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Todos os indivíduos assinaram o termo de consentimento esclarecido após uma explicação clara e detalhada sobre os procedimentos a serem realizados no estudo.

Quinhentos e vinte e sete indivíduos participaram deste estudo, sendo trezentos e três pacientes com transtorno bipolar tipo I e II (idade média de $41,43 \pm 13,09$) e duzentos e vinte e quatro controles (idade média $49,77 \pm 21,88$). Todos os indivíduos do estudo são caucasianos auto-declarados e foram selecionados no Ambulatório de Transtorno Bipolar (Instituto de Previdência do Estado de Minas Gerais) e no Programa do Transtorno de Humor Bipolar (Hospital de Clínicas de Porto Alegre). O diagnóstico psiquiátrico foi realizado por psiquiatras experientes, através do MINIPLUS, que é uma entrevista clínica estruturada que segue os critérios do DSM-IV. Os indivíduos controle foram criteriosamente selecionados, utilizando o MINIPLUS, e não apresentavam história prévia e/ou atual de transtornos psiquiátricos e não possuíam familiares de primeiro grau com transtornos neuropsiquiátricos. Os dados demográficos e clínicos estão na tabela 1.

Tabela 1 – Dados demográficos e clínicos da população estudada.

<i>Dados demográficos e clínicos</i>		
<i>Média ±DP ou %(N)</i>		
	Casos	Controles
Sexo (Feminino)	70,95% (215)	67,85% (152)
Idade	41,43 ±13,09	49,77 ±21,88
Transtorno Bipolar tipo I	74,91% (227)	NA
História de tentativa de suicídio	46,20% (140)	NA
História de hospitalização	72,27% (219)	NA
Comorbidade pânico	15,5% (47)	NA
Tabagismo	48,18% (146)	NA

NA = não se aplica

III.II – Estudo Genotípico

III.II.I – Extração de DNA

Após exame clínico, todos os participantes foram submetidos à coleta de sangue venoso periférico em tubos contendo anti-coagulante EDTA. A extração do DNA foi realizada pelo método de extração salina (Lahiri & Nurnberger 1991).

III.II.II – Reação em cadeia de polimerase com sonda TaqMan®

A PCR (*polymerase chain reaction*) é uma técnica onde são usadas elevadas temperaturas que separam as moléculas de DNA em duas cadeias simples, permitindo então a ligação de oligonucleótidos iniciadores (*primers*), também em cadeia simples, obtidos por síntese química. Para amplificar uma determinada

região são necessários dois iniciadores complementares das seqüências que se ligam ao fragmento de DNA a amplificar, nos seus terminais 3' e 5', de modo a permitir a atuação da Taq polimerase durante a síntese da cadeia complementar, usando como molde cada uma das duas cadeias simples constituintes do DNA a amplificar. A PCR ocorre em 3 etapas: elevação da temperatura para desnaturação do DNA, redução da temperatura para anelamento dos primers ao DNA de fita simples e novamente elevação da temperatura para extensão da nova fita pela Taq polimerase.

A sonda TaqMan® é um fragmento de DNA marcado usado para hibridizar outra molécula de DNA e é utilizada para detectar seqüências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. Ela apresenta em uma extremidade um fluoróforo, e na outra extremidade um *quencher* (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor). Durante a PCR a sonda TaqMan hibridiza com a seqüência da fita simples de DNA complementar alvo para a amplificação. No processo da amplificação a sonda TaqMan é degradada devido à atividade exonuclease 5' – 3' da Taq polimerase, separando o *quencher* da molécula fluorescente durante a extensão. A separação do fluoróforo do *quencher* resulta em um aumento da intensidade da fluorescência. Assim, durante o processo de amplificação a emissão de luz é aumentada de forma exponencial. Esse aumento da fluorescência ocorre apenas quando a sonda hibridiza e quando a amplificação da seqüência alvo é estabelecida.

A sonda TaqMan® é um tipo de ensaio fornecido pela ABI (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) constituído por dois pares de oligonucleotídeos: *forward* e *reverse*, um marcador – VIC® *dye* – detecta a presença do alelo 1 e um marcador – FAM™ *dye* – detecta a presença do alelo 2.

Realizamos a amplificação a partir da técnica tradicional de PCR descrita por Mullis e cols., 1986. A reação de PCR foi preparada com 3.5µl de *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0.1µl de probe, 3.4µl de água deionizada e 1.0µl de DNA por amostra. As reações foram feitas em placas de reações para 96 amostras, sendo realizada para cada 94 amostras dois controles negativos. A reação de PCR foi realizada com um ciclo de 10 minutos de desnaturação a 95°C, seguido de 50 ciclos de anelamento e extensão cada um deles com 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, respectivamente. Os produtos das reações de PCR foram analisados em equipamento de PCR em tempo real (Mx3500p – Stratagene) no modo de discriminação de alelos. Dez por cento das amostras foram genotipadas novamente, com todos os SNPs, e não encontramos nenhum erro de genotipagem.

III.II.III – Escolha dos polimorfismos a serem estudados

Os estudos de associação de genes com doenças vêm sendo desenhados com o objetivo de conseguir-se uma boa cobertura do gene e um custo mais baixo. Um dos métodos que vem sendo utilizado é o baseado em haplótipos, a qual são selecionados polimorfismos representativos de um ou mais haplótipos, os assim denominados "tagSNPs", que são transmitidos junto com os polimorfismos que os representam. Nosso estudo de associação foi baseado em tagSNPs.

Os tagSNPs foram escolhidos através do Projeto Internacional HapMap (<http://www.hapmap.org/>) e adquiridos na Applied Biosystems®. Os marcadores utilizados são correspondentes aos polimorfismos *rs4448731*, *rs4565946*, *rs11179000*, *rs7955501*, *rs10506645*, *rs4760820*, *rs1487275* e *rs10879357*. As

informações referentes aos marcadores estão na tabela 2 e os ensaios utilizados estão na tabela 3.

Tabela 2 – Informações referentes aos SNPs utilizados.

SNP	Posição	Localização	Alelos*
<i>rs4448731</i>	70615373	Intergênico	T/C
<i>rs4565946</i>	70623036	Intron 2	C/T
<i>rs11179000</i>	70624895	Intron 4	A/T
<i>rs7955501</i>	70636293	Intron 5	T/A
<i>rs10506645</i>	70671767	Intron 7	T/C
<i>rs4760820</i>	70683263	Intron 8	C/G
<i>rs1487275</i>	70700830	Intron 8	A/C
<i>rs10879357</i>	70696559	Intron 8	G/A

*Alelo ancestral/ polimorfismo

Tabela 3 – Relação dos marcadores e sequência alvo dos polimorfismos estudados no gene da TPH2.

TagSNPs	Polimorfismos estudados no gene da TPH2
<i>rs4448731</i>	TTTTCCAGTCCCTGGCAGCCACTAA[C/T]CTACTTTCTGTGTGTGTCTCTCTCT
<i>rs4565946</i>	CACTCTGCCATCAGCTAGTCACGGGG[C/T]CTTAGCTAAGCCATTTAACCCATCT
<i>rs11179000</i>	TTCCAAATGATAAAGCTTCCCTGTAC[A/T]CGTGTTGACTGGAAGCGGGTTAGAA
<i>rs7955501</i>	TGCCTTTTATAACCTAGCATTGGAAG[A/T]GACACACCATCACTCTTGCTGTATC
<i>rs10506645</i>	TAGGGTCCACTCCCGGCTTAGAACTA[C/T]TGGACTTGTAAGTGAATCAAATGCA
<i>rs4760820</i>	GACCACTTTAGTATCTCTACAGAAAG[C/G]TTGAAATAAGCCTCAGGCTTATTTA
<i>rs1487275</i>	CATAACAAAAAGTTATAGGCTAAATT[G/T]GGTGTACTTCACTTATAAGATACTC
<i>rs10879357</i>	GATTACAGGTGTGAGTCACCACGCCC[A/G]GTCTAGGGCTGTAATTTTAGCCTCT

III.III – Análise Estatística

As análises de associação de alelos isolados, genótipos, haplótipos e 1000 permutações foram feitas no programa UNPHASED v.3.0.12 (www.mrcbsu.cam.ac.uk/personal/frank/software/unphased/). O desequilíbrio de ligação e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foram calculados usando o programa Haploview 4.1 (www.broad.mit.edu/mpg/haploview/). O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

IV.I – Resultados de associação com o Transtorno Bipolar

IV.I.I - Análise de associação alélica e genotípica

Na distribuição alélica e genotípica, de todos os SNPs, não encontramos diferenças significativas entre pacientes com TB e indivíduos controle (Tabela 4 e 5).

Tabela 4 – Frequência alélica dos polimorfismos do gene da TPH2 nos casos/controles.

FREQUÊNCIA ALÉLICA				
SNP	Alelo*	Controles (n=224)	Casos (n=303)	p
<i>rs4448731</i>	C	0.45	0.43	0.43
<i>rs4565946</i>	T	0.41	0.41	0.98
<i>rs11179000</i>	T	0.31	0.31	0.89
<i>rs7955501</i>	A	0.59	0.58	0.69
<i>rs10506645</i>	C	0.78	0.76	0.32
<i>rs4760820</i>	G	0.35	0.33	0.49
<i>rs1487275</i>	C	0.30	0.31	0.69
<i>rs10879357</i>	A	0.40	0.41	0.96

*Polimorfismo

Tabela 5 – Frequência genotípica dos polimorfismos do gene da TPH2 nos casos/controles.

FREQUÊNCIA GENOTÍPICA				
SNP	Genótipo*	Controles (n=224)	Casos (n=303)	p
<i>rs4448731</i>	TT/ TC/ CC	0.30/ 0.47/ 0.21	0.33/ 0.46/ 0.19	0.72
<i>rs4565946</i>	CC/ TC/ TT	0.35/ 0.45/ 0.18	0.34/ 0.47/ 0.17	0.88
<i>rs11179000</i>	AA/ TA/ TT	0.48/ 0.40/ 0.11	0.47/ 0.43/ 0.09	0.74
<i>rs7955501</i>	TT/ TA/ AA	0.16/ 0.48/ 0.35	0.18/ 0.46/ 0.35	0.74
<i>rs10506645</i>	TT/ TC/ CC	0.05/ 0.30/ 0.63	0.04/ 0.37/ 0.57	0.26
<i>rs4760820</i>	CC/ GC/ GG	0.44/ 0.39/ 0.15	0.45/ 0.42/ 0.12	0.50
<i>rs1487275</i>	AA/ CA/ CC	0.49/ 0.41/ 0.09	0.45/ 0.46/ 0.08	0.50
<i>rs10879357</i>	GG/ GA/ AA	0.37/ 0.42/ 0.19	0.33/ 0.50/ 0.15	0.21

* 11/ 12/ 22 (22=polimorfismo)

IV.I.II – Análise de associação haplotípica

O haplótipo C-A-T-T (*rs4565946*, *rs11179000*, *rs7955501*, *rs10506645*) estava significativamente mais frequente nos pacientes com TB quando comparado aos indivíduos controle ($p=0.03$) (Tabela 6). Porém esse resultado não permaneceu significativo após o teste de permutação.

Tabela 6 – Frequência haplotípica dos polimorfismos do gene da TPH2 nos casos/controles.

<i>Haplótipos</i>	<i>SNPs*</i>								<i>FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA</i>			
	1	2	3	4	5	6	7	8	Casos (n=303)	Controles (n=224)	<i>p</i>	<i>p**</i>
A	-	C	A	T	T	-	-	-	0.05	0.02	0.03	0.5

*SNPs: (1)rs4448731, (2)rs4565946, (3)rs11179000, (4)rs7955501, (5)rs10506645, (6)rs4760820, (7)rs1487275 e (8)rs10879357.

**valor de p ajustado pelo teste de 1000 permutações

IV.II – Resultados de associação com comportamento suicida

IV.II.I - Análise de associação alélica e genotípica

O grupo de pacientes com transtorno bipolar foi dividido em dois grupos: um grupo com história de comportamento suicida e o outro grupo sem história de comportamento suicida.

Na distribuição alélica e genotípica, de todos os SNPs, não encontramos diferenças significativas entre pacientes com comportamento suicida e pacientes sem tal comportamento (Tabela 7 e 8).

Tabela 7 – Frequência alélica dos polimorfismos do gene da TPH2 no comportamento suicida.

FREQUÊNCIA ALÉLICA				
<i>Tentativa de suicídio</i>				
SNP	Alelo*	Sim (n=140)	Não (n=148)	p
<i>rs4448731</i>	C	0.42	0.44	0.53
<i>rs4565946</i>	T	0.41	0.41	0.80
<i>rs11179000</i>	T	0.31	0.31	0.92
<i>rs7955501</i>	A	0.58	0.59	0.77
<i>rs10506645</i>	C	0.75	0.77	0.45
<i>rs4760820</i>	G	0.35	0.33	0.59
<i>rs1487275</i>	C	0.32	0.30	0.56
<i>rs10879357</i>	A	0.41	0.40	0.86

*Polimorfismo

Tabela 8 – Freqüência genotípica dos polimorfismos do gene da TPH2 no comportamento suicida.

FREQUÊNCIA GENOTÍPICA				
Tentativa de suicídio				
SNP	Genótipo*	Sim (n=140)	Não (n=148)	p
<i>rs4448731</i>	TT/ TC/ CC	0.32/ 0.49/ 0.17	0.32/ 0.46/ 0.21	0.62
<i>rs4565946</i>	CC/ TC/ TT	0.33/ 0.50/ 0.15	0.35/ 0.45/ 0.19	0.48
<i>rs11179000</i>	AA/ TA/ TT	0.45/ 0.47/ 0.07	0.48/ 0.40/ 0.11	0.22
<i>rs7955501</i>	TT/ TA/ AA	0.17/ 0.49/ 0.33	0.17/ 0.46/ 0.35	0.84
<i>rs10506645</i>	TT/ TC/ CC	0.05/ 0.37/ 0.57	0.05/ 0.33/ 0.60	0.73
<i>rs4760820</i>	CC/ GC/ GG	0.42/ 0.44/ 0.13	0.45/ 0.40/ 0.13	0.68
<i>rs1487275</i>	AA/ CA/ CC	0.44/ 0.46/ 0.09	0.47/ 0.43/ 0.08	0.79
<i>rs10879357</i>	GG/ GA/ AA	0.33/ 0.50/ 0.16	0.36/ 0.46/ 0.17	0.72

* 11/ 12/ 22 (22=polimorfismo)

IV.II.II – Análise de associação haplotípica

O haplótipo A-T-C-A (*rs7955501-rs10506645-rs4760820-rs1487275*) apareceu apenas no grupo que apresenta comportamento suicida ($p=0.04$). O haplótipo C-G-A-A (*rs10506645-rs4760820-rs1487275-rs10879357*) foi significativamente mais frequente no grupo de pacientes que apresentam comportamento suicida quando comparado ao grupo sem comportamento suicida ($p=0.04$) (Tabela 9). Porém esses resultados não permaneceram significativos após o teste de permutação.

Tabela 9 – Frequência haplotípica dos polimorfismos do gene da TPH2 no comportamento suicida.

Haplótipos	SNPs*								FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA Tentativa de suicídio			
	1	2	3	4	5	6	7	8	Sim (n=140)	Não (n=148)	p	p**
A	-	-	-	A	T	C	A	-	0.008	0	0.04	0.4
B	-	-	-	-	C	G	A	A	0.05	0.02	0.04	0.4

*SNPs: (1)rs4448731, (2)rs4565946, (3)rs11179000, (4)rs7955501, (5)rs10506645, (6)rs4760820, (7)rs1487275 e (8)rs10879357.

**valor de p após o teste de 1000 permutações.

IV.III – Resultados de associação com comorbidade de transtorno do pânico

IV.III.I - Análise de associação alélica e genotípica

Nos *rs11179000*, *rs1487275*, *rs10879357*, encontramos associação entre a frequência do alelo polimórfico e a presença da comorbidade pânico; os alelos T ($p=0,04$), C ($p=0,02$) e A ($p=0,02$), respectivamente, estão significativamente mais frequentes nos pacientes com TB com comorbidade pânico. Nos *rs4448731*, *rs4565946*, *rs4760820*, encontramos associação entre a frequência do alelo polimórfico e a ausência da comorbidade pânico; os alelos C ($p=0,001$), T ($p=0,01$) e G ($p=0,007$) respectivamente, estão significativamente mais frequentes nos pacientes com TB sem comorbidade pânico (Tabela 10).

Tabela 10 – Frequência alélica dos polimorfismos do gene da TPH2 na comorbidade pânico.

FREQUÊNCIA ALÉLICA				
Comorbidade pânico				
SNP	Alelo*	Presença (n=47)	Ausência (n=238)	p
<i>rs4448731</i>	C	0.28	0.45	0.001
<i>rs4565946</i>	T	0.29	0.42	0.01
<i>rs11179000</i>	T	0.40	0.30	0.04
<i>rs7955501</i>	A	0.55	0.59	0.45
<i>rs10506645</i>	C	0.74	0.77	0.49
<i>rs4760820</i>	G	0.22	0.35	0.007
<i>rs1487275</i>	C	0.41	0.30	0.02
<i>rs10879357</i>	A	0.52	0.39	0.02

*Polimorfismo

Nos *rs4448731*, *rs4565946*, *rs4760820* observamos que os genótipos homozigotos TT ($p=0,0004$), TT ($p=0,005$) e GG ($p=0,006$), respectivamente, estão mais frequentes nos pacientes com comorbidade pânico, e nos *rs4448731*, *rs11179000*, *rs4760820*, *rs1487275* e *rs10879357* observamos que os genótipos TC ($p=0,03$), TT ($p=0,05$), GC ($p=0,04$), CC ($p=0,01$) e GG ($p=0,01$) estão mais frequentes nos pacientes sem comorbidade pânico (Tabela 11).

Tabela 11 – Frequência genotípica dos polimorfismos do gene da TPH2 .

FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA				
Comorbidade pânico				
SNP	Genótipo*	Presença (n=47)	Ausência (n=238)	Valor de p
<i>rs4448731</i>	TT / TC /CC	0.55 / 0.31 / 0.12	0.30 / 0.48 / 0.21	0.0004 / 0.03 / 0.1
<i>rs4565946</i>	CC / TC /TT	0.12 / 0.34 / 0.53	0.18 / 0.48 / 0.33	0.30 / 0.06 / 0.005
<i>rs11179000</i>	AA / TA /TT	0.14 / 0.51 / 0.34	0.09 / 0.41 / 0.49	0.25 / 0.19 / 0.05
<i>rs7955501</i>	TT / TA /AA	0.19 / 0.51 / 0.29	0.17 / 0.46 / 0.35	0.74 / 0.58 / 0.40
<i>rs10506645</i>	TT / TC /CC	0.04 / 0.42 / 0.53	0.05 / 0.33 / 0.60	0.73 / 0.23 / 0.32
<i>rs4760820</i>	CC / GC /GG	0.08 / 0.27 / 0.63	0.14 / 0.42 / 0.43	0.27 / 0.04 / 0.006
<i>rs1487275</i>	AA / CA /CC	0.13 / 0.56 / 0.30	0.08 / 0.42 / 0.48	0.31 / 0.07 / 0.01
<i>rs10879357</i>	GG / GA /AA	0.19 / 0.57 / 0.23	0.37 / 0.46 / 0.16	0.01 / 0.13 / 0.25

* 11/ 12/ 22 (22=polimorfismo)

IV.III.II – Análise de associação haplotípica

O haplotipo T-C (*rs4448731*, *rs4565946*) está significativamente mais frequente nos pacientes com TB com comorbidade pânico ($p_{\text{corrigido}} = 0,02$). Os haplótipos T-A (*rs11179000*, *rs7955501*; $p_{\text{corrigido}} = 0,03$), C-G (*rs10506645*, *rs4760820*; $p_{\text{corrigido}} = 0,04$), G-A (*rs4760820*, *rs1487275*; $p_{\text{corrigido}} = 0,03$) e A-G (*rs1487275*, *rs10879357*; $p_{\text{corrigido}} = 0,02$) estão significativamente mais frequentes nos pacientes com TB sem comorbidade pânico (Tabela 12). Esses resultados permaneceram significativos após o teste de permutação.

Tabela 12 – Frequência haplotípica dos polimorfismos do gene da TPH2 na comorbidade pânico.

Haplótipos	SNPs*								FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA Comorbidade pânico			
	1	2	3	4	5	6	7	8	Presença (n=47)	Ausência (n=238)	p	p**
A	T	C	-	-	-	-	-	-	0.68	0.53	0.005	0.02
B	-	-	T	A	-	-	-	-	0.19	0.09	0.009	0.03
C	-	-	-	-	C	G	-	-	0.22	0.35	0.01	0.04
D	-	-	-	-	-	G	A	-	0.18	0.34	0.004	0.03
E	-	-	-	-	-	-	A	G	0.43	0.58	0.006	0.02

*SNPs: (1)rs4448731, (2)rs4565946, (3)rs11179000, (4)rs7955501, (5)rs10506645, (6)rs4760820, (7)rs1487275 e (8)rs10879357.

**valor de p ajustado pelo teste de 1000 permutações.

IV.IV - Desequilíbrio de ligação

Encontramos forte desequilíbrio de ligação entre os *rs10506645* (intron 7) e *rs4760820* (intron 8), com valor $D'=0,95$ (Figura 3). Todos os SNPs estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

V. DISCUSSÃO

Como já foi citado na introdução, sabe-se hoje dos efeitos da disfunção serotoninérgica nos transtornos de humor. Genes relacionados à serotonina são fortes candidatos para estudo desses transtornos. Variantes no gene da TPH2, enzima limitante da via de síntese da serotonina, vem sendo estudadas por diversos pesquisadores, porém os achados ainda são conflitantes.

O objetivo do nosso estudo foi verificar se há associação entre polimorfismos no gene da TPH2 e a susceptibilidade ao TB, ao comportamento suicida e a comorbidades. Genotipamos 303 pacientes e 224 controles, utilizando 8 tagSNPs do gene da TPH2 e não encontramos diferenças significativas na frequência dos polimorfismos entre os pacientes com TB e os controles. Também não encontramos diferenças significativas na frequência dos polimorfismos entre os pacientes com TB que tentaram ou não suicídio.

Até o momento nenhum estudo levou a evidências convincentes sobre o envolvimento da TPH2 na patogênese do TB e/ou suicídio. A descoberta da TPH2 é recente e o número de estudos ainda restrito. Além disso, outros fatores como critérios de seleção amostral diferentes podem tornar os resultados conflitantes. Quatro autores estudaram os SNPs rs1487275, rs4448731 e rs4760820 (Cichon e cols. 2008; Lopez de Lara e cols. 2007; Van Den Bogaert e cols. 2006; Grigoriu-Serbanescu e cols. 2008) presentes nesta pesquisa. Apenas Lopez de Lara encontrou associação positiva do rs4448731 com a susceptibilidade ao suicídio em pacientes com depressão maior. Outros autores encontraram associações positivas, porém utilizando SNPs diferentes dos utilizados nesta pesquisa.

Mann e colaboradores (2008) genotiparam 109 pacientes com TB, 324 pacientes com depressão maior e 130 controles utilizando o SNP rs4131347 e não encontraram associação entre o genótipo e os transtornos de humor e

tentativa de suicídio. Os autores sugerem que em transtornos complexos como o TB há provavelmente envolvimento de múltiplos genes e fenômenos epigenéticos, e assim, estudos com SNPs únicos fornecerão somente uma visão parcial da base genética dos transtornos complexos.

De Luca e colaboradores (2006) pesquisaram 2 haplótipos (-473T>A e -8396G>C) em pacientes suicidas bipolares e esquizofrênicos, e não encontraram associação desses haplótipos com o suicídio. Os autores concluem que outros estudos devem ser feitos com amostras maiores e diagnósticos mais bem delimitados, como tipo de TB e subtipos de esquizofrenia.

Em relação à comorbidade pânico, encontramos diferenças significativas dos polimorfismos entre os pacientes com TB com e sem comorbidade pânico, sugerindo fatores de risco ou proteção para susceptibilidade à comorbidade pânico. Três estudos recentes avaliaram polimorfismos no gene da TPH2, porém comparando grupo de pacientes com transtorno do pânico com grupo controle (Kim e cols. 2009; Maron e cols. 2007; Mossner e cols. 2006).

Kim e colaboradores (2009) e Mossner e colaboradores (2006) estudaram o polimorfismo funcional rs4570625 em pacientes com TP e controles. O primeiro encontrou diferença significativa da frequência alélica entre pacientes com TP e controles. Já o segundo autor não encontrou diferenças significativas entre os grupos e sugere estudos futuros de interação gene-ambiente no TP.

Os dois estudos citados acima são os dois únicos estudos que pesquisaram o SNP funcional rs4570625 no TP. Como alguns estudos sugerem o impacto dessa variante na resposta da amígdala aos estímulos emocionais (Brown e cols. 2005; Canli e cols. 2005) estudos futuros devem ser feitos para confirmar ou não os achados.

Maron e colaboradores (2007) encontraram associação positiva do rs1386494 com o grupo de pacientes mulheres com TP.

Nossos achados positivos necessitam de replicação, pois é o primeiro estudo a avaliar polimorfismos no gene da TPH2 e a susceptibilidade a comorbidade pânico em pacientes com TB.

Algumas limitações do nosso estudo devem ser levadas em consideração. Em todo estudo caso-controle de genética psiquiátrica existe a possibilidade de resultados falso-positivos e falso-negativos devido à estratificação étnica e tamanho da amostra. Nós tentamos controlar essas variáveis, incluindo somente caucasianos auto declarados em nossa amostra. Porém, como demonstrado anteriormente, a ancestralidade étnica no Brasil não pode ser facilmente avaliada apenas com base no exame físico (Parra e cols. 2003). Outra limitação é o tamanho da nossa amostra, que através do cálculo amostral deveria ser de 382 pacientes com TB.

Verificamos o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), uma vez que desvio de EHW freqüentemente se deve a consangüinidade, estratificação populacional, ou erro no experimento podendo levar a associações estatisticamente significativas ao acaso. Todos os SNPs estavam em EHW.

Realizamos também o teste de permutações, no programa UNPHASED com 1000 permutações, com correção do melhor valor de p. É um teste que vem sendo muito utilizado nos estudos genéticos afim de evitar o efeito de múltiplos testes (Banding 2006), excluindo a possibilidade de falso-positivos.

Concluindo, os estudos de associação conduzidos até o presente momento não foram capazes de estabelecer resultados definitivos, haja vista que, além de encontrarmos resultados negativos, a maioria dos achados positivos não

pôde ser replicada. Genes envolvidos no sistema serotoninérgico continuam sendo genes candidatos para estudos dos transtornos de humor, porém estudos maiores, envolvendo interação gene-gene e gene-ambiente são necessários para um maior entendimento da etiopatogenia dos transtornos de humor.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Ackenheil, M. (2001) Neurotransmitters and signal transduction processes in bipolar affective disorders: a synopsis. *J Affect Disord*, **62**, 101-111.
- American Psychiatric Association (1994) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (fourth edition)*, American Psychiatric Association, Washington, DC.
- Angst, J., Gamma, A., Benazzi, F., Ajdacic, V., Eich, D., Rössler, W. (2003) Toward a re-definition of subthreshold bipolarity: epidemiology and proposed criteria for bipolar-II, minor bipolar disorders and hypomania. *J Affect Disord*, **73**, 133-146.
- Baldessarini, R.J., Pompili, M., Tondo, L. (2006) Suicide in bipolar disorder: Risks and management. *CNS Spectr*, **11**, 465-471.
- Balding, D.J. (2006) A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet*, **7**, 781-791.
- Brent, D.A., Bridge, J., Johnson, B. A., Connolly, J. (1996) Suicidal behavior runs in families. A controlled family study of adolescent suicide victims. *Arch Gen Psychiatry*, **53**, 1145-1152.
- Brent, D.A., Perper, J. A., Goldstein, C. E., Kolko, D. J., Allan, M. J., Allman, C. J., Zelenak, J. P. (1988) Risk factors for adolescent suicide. A comparison of adolescent suicide victims with suicidal inpatients. *Arch Gen Psychiatry*, **45**, 581-588.
- Brown, S.M., Peet, E., Manuck, S.B., Williamson, D.E., Dahl, R.E., Ferrell, R.E. & Hariri, A.R. (2005) A regulatory variant of the human tryptophan hydroxylase-2 gene biases amygdala reactivity. *Mol Psychiatry*, **10**, 884-888, 805.
- Brunello, N., Tascetta, F. (2003) Cellular mechanisms and second messengers: relevance to the psychopharmacology of bipolar disorders. *Int J Neuropsychopharmacol*, **6**, 181-189.
- Calabrese, J.R., Hirschfeld, R. M., Frye, M. A., Reed, M. L. (2004) Impact of depressive symptoms compared with manic symptoms in bipolar disorder: results of a U.S. community-based sample. *J Clin Psychiatry*, **65**, 1499-1504.
- Canli, T., Congdon, E., Gutknecht, L., Constable, R.T. & Lesch, K.P. (2005) Amygdala responsiveness is modulated by tryptophan hydroxylase-2 gene variation. *J Neural Transm*, **112**, 1479-1485.
- Cardno, A.G., Marshall, E. J., Coid, B., Macdonald, A. M., Ribchester, T. R., Davies, N. J., Venturi, P., Jones, L. A., Lewis, S. W., Sham, P. C., Gottesman, I., Farmer, A. E., McGuffin, P., Reveley, A. M., Murray, R. M.

- (1999) Heritability estimates for psychotic disorders: the Maudsley twin psychosis series. *Arch Gen Psychiatry*, **56**, 162-168.
- Charney, D.S. & Manji, H.K. (2004) Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. *Sci STKE*, **225**, re5.
- Chen, Y.W. & Dilsaver, S.C. (1995) Comorbidity of panic disorder in bipolar illness: evidence from the Epidemiologic Catchment Area Survey. *Am J Psychiatry*, **152**, 280-282.
- Cichon, S., Winge, I., Mattheisen, M., Georgi, A., Karpushova, A., Freudenberg, J., Freudenberg-Hua, Y., Babadjanova, G., Van Den Bogaert, A., Abramova, L.I., Kapiletti, S., Knappskog, P.M., McKinney, J., Maier, W., Jamra, R.A., Schulze, T.G., Schumacher, J., Propping, P., Rietschel, M., Haavik, J. & Nothen, M.M. (2008) Brain-specific tryptophan hydroxylase 2 (TPH2): a functional Pro206Ser substitution and variation in the 5'-region are associated with bipolar affective disorder. *Hum Mol Genet*, **17**, 87-97.
- Cole, A.J., Scott, J., Ferrier, I.N. & Eccleston, D. (1993) Patterns of treatment resistance in bipolar affective disorder. *Acta Psychiatr Scand*, **88**, 121-123.
- Correa, H., Duval, F., Mokrani, M., Bailey, P., Tremeau, F., Staner, L., Diep, T.S., Hode, Y., Crocq, M.A. & Macher, J.P. (2000) Prolactin response to D-fenfluramine and suicidal behavior in depressed patients. *Psychiatry Res*, **93**, 189-199.
- Correa, H., Duval, F., Mokrani, M.C., Bailey, P., Tremeau, F., Staner, L., Diep, T.S., Crocq, M.A. & Macher, J.P. (2002) Serotonergic function and suicidal behavior in schizophrenia. *Schizophr Res*, **56**, 75-85.
- Craddock, N. & Jones, I. (1999) Genetics of bipolar disorder. *J Med Genet*, **36**, 585-594.
- Dahlstrom, A. & Fuxe, K. (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, **20**, 398-399.
- De Luca, V., Hlousek, D., Likhodi, O., Van Tol, H.H., Kennedy, J.L. & Wong, A.H. (2006) The interaction between TPH2 promoter haplotypes and clinical-demographic risk factors in suicide victims with major psychoses. *Genes Brain Behav*, **5**, 107-110.
- Doughty, C.J., Wells, J.E., Joyce, P.R., Olds, R.J. & Walsh, A.E. (2004) Bipolar-panic disorder comorbidity within bipolar disorder families: a study of siblings. *Bipolar Disord*, **6**, 245-252.
- Erspamer, V. & Asero, B. (1952) Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature*, **169**, 800-801.

- Feske, U., Frank, E., Mallinger, A.G., Houck, P.R., Fagiolini, A., Shear, M.K., Grochocinski, V.J. & Kupfer, D.J. (2000) Anxiety as a correlate of response to the acute treatment of bipolar I disorder. *Am J Psychiatry*, **157**, 956-962.
- Fitzpatrick, P.F. (1999) Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu Rev Biochem*, **68**, 355-381.
- Goodwin, F.K., Jamison, K.R. (1990) *Manic-Depressive Illness*, Oxford University Press, New York.
- Grigoriou-Serbanescu, M., Diaconu, C.C., Herms, S., Bleotu, C., Vollmer, J., Muhleisen, T.W., Preliceanu, D., Priebe, L., Mihailescu, R., Georgescu, M.J., Sima, D., Grimberg, M., Nothen, M.M. & Cichon, S. (2008) Investigation of the tryptophan hydroxylase 2 gene in bipolar I disorder in the Romanian population. *Psychiatr Genet*, **18**, 240-247.
- Harvey, M., Gagne, B., Labbe, M. & Barden, N. (2007) Polymorphisms in the neuronal isoform of tryptophan hydroxylase 2 are associated with bipolar disorder in French Canadian pedigrees. *Psychiatr Genet*, **17**, 17-22.
- Harvey, M., Shink, E., Tremblay, M., Gagne, B., Raymond, C., Labbe, M., Walther, D.J., Bader, M. & Barden, N. (2004) Support for the involvement of TPH2 gene in affective disorders. *Mol Psychiatry*, **9**, 980-981.
- Judd, L.L. & Akiskal, H.S. (2003) The prevalence and disability of bipolar spectrum disorders in the US population: re-analysis of the ECA database taking into account subthreshold cases. *J Affect Disord*, **73**, 123-131.
- Ke, L., Qi, Z.Y., Ping, Y. & Ren, C.Y. (2006) Effect of SNP at position 40237 in exon 7 of the TPH2 gene on susceptibility to suicide. *Brain Res*, **1122**, 24-26.
- Kendler, K.S., Karkowski-Shuman, L. (1997) Stressful life events and genetic liability to major depression: Genetic control of exposure to the environment. *Psychol. Med.*, **27**, 539-547.
- Kendler, K.S., Karkowski, L.M., Prescott, C.A. (1999) Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am. J. Psychiatry* **156**, 837-841.
- Kessler, R.C., Rubinow, D.R., Holmes, C., Abelson, J.M. & Zhao, S. (1997) The epidemiology of DSM-III-R bipolar I disorder in a general population survey. *Psychol Med*, **27**, 1079-1089.
- Kilbourne, A.M., Cornelius, J.R., Han, X., Pincus, H.A., Shad, M., Salloum, I., Conigliaro, J. & Haas, G.L. (2004) Burden of general medical conditions among individuals with bipolar disorder. *Bipolar Disord*, **6**, 368-373.

- Kim, Y.K., Lee, H.J., Yang, J.C., Hwang, J.A. & Yoon, H.K. (2009) A tryptophan hydroxylase 2 gene polymorphism is associated with panic disorder. *Behav Genet*, **39**, 170-175.
- Lahiri, D.K. & Nurnberger, J.I., Jr. (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*, **19**, 5444.
- Li, D. & He, L. (2007) Meta-analysis supports association between serotonin transporter (5-HTT) and suicidal behavior. *Mol Psychiatry*, **12**, 47-54.
- Lidov, H.G. & Molliver, M.E. (1982) An immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: ascending pathways and terminal fields. *Brain Res Bull*, **8**, 389-430.
- Lin, Y.M., Chao, S.C., Chen, T.M., Lai, T.J., Chen, J.S. & Sun, H.S. (2007) Association of functional polymorphisms of the human tryptophan hydroxylase 2 gene with risk for bipolar disorder in Han Chinese. *Arch Gen Psychiatry*, **64**, 1015-1024.
- Lopez de Lara, C., Brezo, J., Rouleau, G., Lesage, A., Dumont, M., Alda, M., Benkelfat, C. & Turecki, G. (2007) Effect of tryptophan hydroxylase-2 gene variants on suicide risk in major depression. *Biol Psychiatry*, **62**, 72-80.
- Lopez, V.A., Detera-Wadleigh, S., Cardona, I., Kassem, L. & McMahon, F.J. (2007) Nested association between genetic variation in tryptophan hydroxylase II, bipolar affective disorder, and suicide attempts. *Biol Psychiatry*, **61**, 181-186.
- MacKinnon, D.F., McMahon, F.J., Simpson, S.G., McInnis, M.G. & DePaulo, J.R. (1997) Panic disorder with familial bipolar disorder. *Biol Psychiatry*, **42**, 90-95.
- MacKinnon, D.F., Xu, J., McMahon, F.J., Simpson, S.G., Stine, O.C., McInnis, M.G. & DePaulo, J.R. (1998) Bipolar disorder and panic disorder in families: an analysis of chromosome 18 data. *Am J Psychiatry*, **155**, 829-831.
- MacKinnon, D.F., Zandi, P.P., Cooper, J., Potash, J.B., Simpson, S.G., Gershon, E., Nurnberger, J., Reich, T. & DePaulo, J.R. (2002) Comorbid bipolar disorder and panic disorder in families with a high prevalence of bipolar disorder. *Am J Psychiatry*, **159**, 30-35.
- Mann, J.J., Arango, V. & Underwood, M.D. (1990) Serotonin and suicidal behavior. *Ann N Y Acad Sci*, **600**, 476-484; discussion 484-475.
- Mann, J.J., Currier, D., Murphy, L., Huang, Y.Y., Galfalvy, H., Brent, D., Greenhill, L. & Oquendo, M. (2008) No association between a TPH2 promoter polymorphism and mood disorders or monoamine turnover. *J Affect Disord*, **106**, 117-121.

- Maron, E., Toru, I., Must, A., Tasa, G., Toover, E., Vasar, V., Lang, A. & Shlik, J. (2007) Association study of tryptophan hydroxylase 2 gene polymorphisms in panic disorder. *Neurosci Lett*, **411**, 180-184.
- Meltzer, H. (1989) Serotonergic dysfunction in depression. *Br J Psychiatry Suppl*, 25-31.
- Mendlewicz, J. & Rainer, J.D. (1977) Adoption study supporting genetic transmission in manic--depressive illness. *Nature*, **268**, 327-329.
- Mossner, R., Freitag, C.M., Gutknecht, L., Reif, A., Tauber, R., Franke, P., Fritze, J., Wagner, G., Peikert, G., Wenda, B., Sand, P., Rietschel, M., Garritsen, H., Jacob, C., Lesch, K.P. & Deckert, J. (2006) The novel brain-specific tryptophan hydroxylase-2 gene in panic disorder. *J Psychopharmacol*, **20**, 547-552.
- Murphy, D.L., Uhl, G.R., Holmes, A., Ren-Patterson, R., Hall, F.S., Sora, I., Detera-Wadleigh, S. & Lesch, K.P. (2003) Experimental gene interaction studies with SERT mutant mice as models for human polygenic and epistatic traits and disorders. *Genes Brain Behav*, **2**, 350-364.
- Nielsen, D.A., Virkkunen, M., Lappalainen, J., Eggert, M., Brown, G.L., Long, J.C., Goldman, D. & Linnoila, M. (1998) A tryptophan hydroxylase gene marker for suicidality and alcoholism. *Arch Gen Psychiatry*, **55**, 593-602.
- Paik, I., Toh, K., Kim, J. & Lee, C. (2000) TPH gene may be associated with suicidal behavior, but not with schizophrenia in the Korean population. *Hum Hered*, **50**, 365-369.
- Parra, F.C., Amado, R.C., Lambertucci, J.R., Rocha, J., Antunes, C.M. & Pena, S.D. (2003) Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 177-182.
- Paykel, E.S. (2003) Life events and affective disorders. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, (**Suppl.**), 61-66.
- Placidi, G.P., Oquendo, M.A., Malone, K.M., Huang, Y.Y., Ellis, S.P. & Mann, J.J. (2001) Aggressivity, suicide attempts, and depression: relationship to cerebrospinal fluid monoamine metabolite levels. *Biol Psychiatry*, **50**, 783-791.
- Puizillout, J.J., Gaudin-Chazal, G., Daszuta, A., Seyfritz, N. & Ternaux, J.P. (1979) Release of endogenous serotonin from "encephale isole" cats. II - Correlations with raphe neuronal activity and sleep and wakefulness. *J Physiol (Paris)*, **75**, 531-537.
- Rapport, M.M., Green, A.A. & Page, I.H. (1948) Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem*, **176**, 1243-1251.

- Rotondo, A., Mazzanti, C., Dell'Osso, L., Rucci, P., Sullivan, P., Bouanani, S., Gonnelli, C., Goldman, D. & Cassano, G.B. (2002) Catechol o-methyltransferase, serotonin transporter, and tryptophan hydroxylase gene polymorphisms in bipolar disorder patients with and without comorbid panic disorder. *Am J Psychiatry*, **159**, 23-29.
- Roy, A. (1993) Genetic and biologic risk factors for suicide in depressive disorders. *Psychiatr Q*, **64**, 345-358.
- Schulsinger, F., Kety, S.S., Rosenthal, D., Wender, P.H. (1979) A family study of suicide. *Origins, prevention, and treatment of affective disorders*. Academic Press Inc, London, pp. 277 - 287.
- Segal, J., Pujol, C., Birck, A., Gus Manfro, G. & Leistner-Segal, S. (2006) Association between suicide attempts in south Brazilian depressed patients with the serotonin transporter polymorphism. *Psychiatry Res*, **143**, 289-291.
- Serretti, A. & Mandelli, L. (2008) The genetics of bipolar disorder: genome 'hot regions,' genes, new potential candidates and future directions. *Mol Psychiatry*, **13**, 742-771.
- Sharma, V., Mazmanian, D., Persad, E. & Kueneman, K. (1995) A comparison of comorbid patterns in treatment-resistant unipolar and bipolar depression. *Can J Psychiatry*, **40**, 270-274.
- Shiah, I.S. & Yatham, L.N. (2000) Serotonin in mania and in the mechanism of action of mood stabilizers: a review of clinical studies. *Bipolar Disord*, **2**, 77-92.
- Tondo, L., Isacsson, G. & Baldessarini, R. (2003) Suicidal behaviour in bipolar disorder: risk and prevention. *CNS Drugs*, **17**, 491-511.
- Van Den Bogaert, A., Slegers, K., De Zutter, S., Heyrman, L., Norrback, K.F., Adolfsson, R., Van Broeckhoven, C. & Del-Favero, J. (2006) Association of brain-specific tryptophan hydroxylase, TPH2, with unipolar and bipolar disorder in a Northern Swedish, isolated population. *Arch Gen Psychiatry*, **63**, 1103-1110.
- Vieta, E., Colom, F., Corbella, B., Martinez-Aran, A., Reinares, M., Benabarre, A. & Gasto, C. (2001) Clinical correlates of psychiatric comorbidity in bipolar I patients. *Bipolar Disord*, **3**, 253-258.
- Wallace, J.A. & Lauder, J.M. (1983) Development of the serotonergic system in the rat embryo: an immunocytochemical study. *Brain Res Bull*, **10**, 459-479.
- Walther, D.J. & Bader, M. (2003) A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol*, **66**, 1673-1680.

- Walther, D.J., Peter, J.U., Bashammakh, S., Hortnagl, H., Voits, M., Fink, H. & Bader, M. (2003) Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*, **299**, 76.
- Young, L.T., Cooke, R.G., Robb, J.C., Levitt, A.J. & Joffe, R.T. (1993) Anxious and non-anxious bipolar disorder. *J Affect Disord*, **29**, 49-52.
- Young, L.T., Warsh, J.J., Kish, S.J., Shannak, K. & Hornykeiwicz, O. (1994) Reduced brain 5-HT and elevated NE turnover and metabolites in bipolar affective disorder. *Biol Psychiatry*, **35**, 121-127.
- Zill, P., Baghai, T.C., Zwanzger, P., Schule, C., Eser, D., Rupprecht, R., Moller, H.J., Bondy, B. & Ackenheil, M. (2004a) SNP and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene provide evidence for association with major depression. *Mol Psychiatry*, **9**, 1030-1036.
- Zill, P., Buttner, A., Eisenmenger, W., Bondy, B. & Ackenheil, M. (2004b) Regional mRNA expression of a second tryptophan hydroxylase isoform in postmortem tissue samples of two human brains. *Eur Neuropsychopharmacol*, **14**, 282-284.
- Zill, P., Buttner, A., Eisenmenger, W., Moller, H.J., Bondy, B. & Ackenheil, M. (2004c) Single nucleotide polymorphism and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene in suicide victims. *Biol Psychiatry*, **56**, 581-586.